الكشف عن لحوم ودهون الخنزير فى المنتجات الغذائية

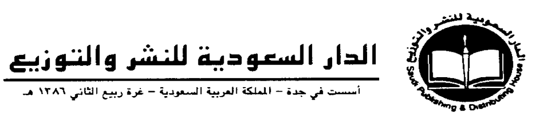
إعـداد

د. محمد محمد محمد هاشم

أستاذ بكلية الطب البيطرى جامعة القاهرة
مستشار جامعة القاهرة لشئون التغذية سابقًا
المستشار العلمى لهيئة المواصفات والمقاييس لدول مجلس التعاون لدول الخليج العربية سابقًا
خبير الصناعات الغذائية بالدار السعودية للخدمات الاستشارية سابقًا
رئيس وحدة أبحاث تجارب الحيوان بكلية الطب
جامعة الملك عبد العزيز سابقًا



الدار السعودية
للنشر والتوزيع



الطبعة الأولى

١٤٢٥ هـ - ٢٠٠٤ م

ح الدار السعودية للنشر والتوزيع ، ١٤٢٢ هـ

فهرسة مكتبة الملك فهد الوطنية أثناء النشر

هاشم ، محمد محمد

الكشف عن لحوم ودهون الخنزير في المنتجات الغذائية
محمد محمد هاشم - جدة ١٤٢٥هـ

٢٣٥ ص : ٢٤ × ١٧ سم

ردمك : ٤ - ١٢٠ - ٢٦ - ٩٩٦٠

١- لحم خنزير ٢- الأغذية - تحليل أ- العنوان

ديوي ٦١٤,٥٦ رقم الإيداع : ٥٢٠٤ / ١٤٢٥

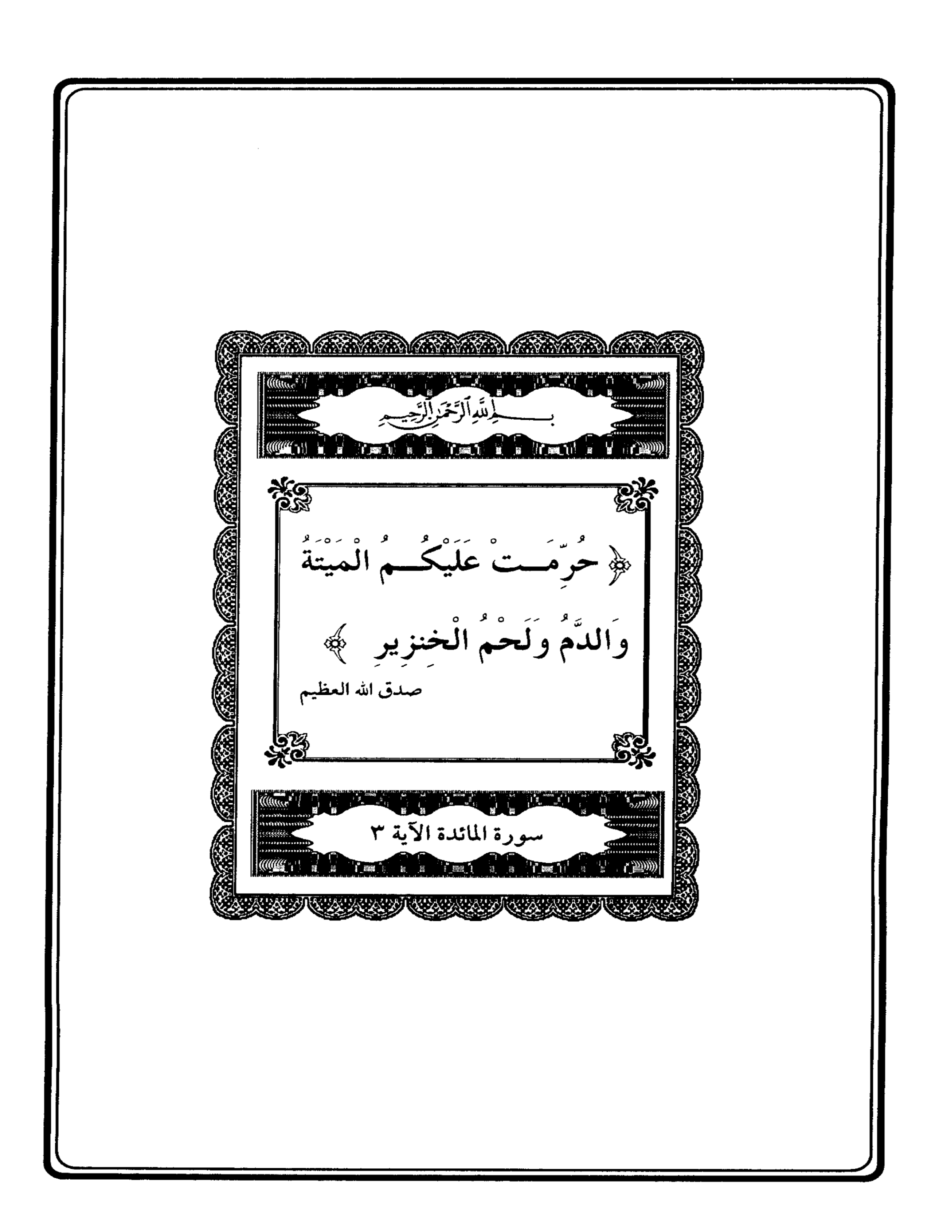
Website : www.spdh-sa.com : موقعنا الإنترنت
E - mail : info@spdh-sa.com : البريد الإلكتروني

المملكة العربية السعودية
المركز الرئيسي : جدة
الإدارة والمستودعات
ت: ٦٢٩٤٠٣٩ - ٦٢٩٣٩٨٨ - ٦٢٩٤٢٧٨
فاكس: ٦٢٩٤٢٩٠
ص.ب ٢٠٤٣ - جدة ٢١٤٥١
فرع الدمام: ص.ب ٨٩٩ الدمام ٣١٤٢١
ت: ٨٣٤٧٧٦٩ - فاكس: ٨٣٣٥٥٢٠
قسم الجملة : هاتف: ٨٣٤٨٣٨٢
المكتبات: ش الظهران: ت: ٨٣٢٣٥١٥
ش الملك سعود- مجمع الحياة بلازا
ت: ٨١٧٥١٦٣
فرع الرياض: ص.ب ٢٩٥٠٦٢ الرياض ١١٣٥١
ت : ٤٦٤٧٨٩٤ - ٤٦٥١٤٦٤

جمهورية مصر العربية
دار القارىء العربي
١٤ شارع عبدالله دراز - أرض الجولف
مصر الجديدة - القاهرة
هاتف: ٢٩٠٦٧١٥ فاكس: ٢٩٠٦٧١٧

UNITED KINGDOM
Makkah Advertising int'i
Crown House, Crown Lane
East Burnham, Bucks SL2 3SQ
United Kingdom
Tel. : (01753) 648701
Fax : (01753) 648707

USA
New Era publications
P.o. Box 130109, Ann Arbor
M1 48113 - 0109



بسم الله الرحمن الرحيم
﴿ حُرِّمَتْ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةُ
وَالدَّمُ وَلَحْمُ الْخِنزِيرِ ﴾
صدق الله العظيم
سورة المائدة الآية ٣



إهداء

إلى حفيدى الأول

عبد الله يحيى محمد هاشم

اللهم اجعله من أهل العلم والدين



الجزء الأول

الكشف عن لحوم الخنزير في المنتجات الغذائية



مقـــدمة

تنص تعاليم الدين الإسلامى السمحاء على ضرورة أن تكون جميع الأغذية خالية من لحم الخنزير والتى تنقل الأمراض المختلفة للإنسان .

وتمثل عـملية كشـف وتقدير لحم الخنـزير المختلط بـلحوم حيوانـية أخرى مشكلة لدى القائمين على تحليل الأغذية ولقد أصبحت هذه المشكلة أكثر أهمية لسببين إحداهما : التأكد من مطابقة المنتج لما تنص عليه البيانات الإيضاحية على العبوة وتحريم بعض الـشعوب لتناول لحم الخنزير وذلك تبعًا للـشرائع السماوية السمحاء .

ويشكـل الكشف - بصـفة عامة - عن وجـود أى لحم حيوانى مـعين فى مخـلوط من اللـحوم الحيوانـية الأخرى صعـوبة كبـيرة خاصة عـندما تتـواجد بتركـيزات منخفضــة . أصبح من الشائـع فى مجال الصـناعات الغذائيـة خلط اللحوم الحيوانية أثناء صناعة مخاليط من اللحوم مندمجة مع بعضها هذه العملية قد ولدت مشكلة لدى القائمين بتحليل الأغذية وأيضًا هناك الشعوب الإسلامية واليهودية تهتـم بأن تتأكد هل المنتج الذى تشتريـه به لحم خنزير أم لا ، علاوة على أن بعض القوانين لا تـلزم المنتجين بكتابة كافة التفاصـيل والمعلومات على البيانات الإيـضاحية التى توضع علـى العبوة من الخارج لكل الأسبـاب السابقة تبرز أهمية التركيز الكيميائى والطبيعى للحوم الخنزير والحيوانات الأخرى وذلك لوضع بعض الطرق والأبحاث المختلفة لـلكشف عن لحم الخنزير والتى نوردها كما ذكرها مؤلفوها حـتى نترك الفرصة لكل مختبر بإختيار الطـريقة التى تناسبه تبعًا لإمكانياته ونـتضرع إلى الله سبحانه وتعالى أن يوفقنـا لإعداد ما فيه حماية للمستهـلك المسلم من أكل لحوم الخنزير أو مـنتجاته تبعًا للشريعـة السمحاء فى هذه النشرة .

ولعـله من فضـول القول أننـا نشير إلـى أننا لا نجزم بـأن هذه النشـرة قد

خرجت خاليا من كل عيب . بعيدًا عن كل نقص لكن الذى نستطيع أن نجزم به وأن نؤكده أننا قدمنا مجهودًا نعرف أنه قليل . راجين أن نستفيد من النقد البناء الذى نرجو أن يقــدمه كل من يهمه تطويــر هذا العمل ليساعدنــا فى ذلك على تحسين هذه النشرة وصقلها وتعديلها فى طبعة قادمة إن شاء الله .

ومن هنا نشير أن الهيئات العربية والعالمية للمواصفات والمقاييس أعطت هذا الموضوع اهتمامًا كبــيرًا فى إيجاد الطرق المختلفة للكشــف عن لحوم الخنزير فى المنتجــات الغذائية فقامــت بعمل مواصفات قــياسية للكشــف عن لحوم ودهون الخنزير فى المنــتجات الغذائية وذلك لحمايــة المستهلك المسلم من تــناول اللحوم المصنعة المخلوطة بلحوم ودهون الخنزير .

المؤلف

الباب الأول

أدلة تحريم الخنزير فى الإسلام

فى القرآن الكريم :

١ - يقول الله تبارك وتعالى : ﴿يَا أَيُّهَا الَّذِينَ آمَنُوا كُلُوا مِن طَيِّبَاتِ مَا رَزَقْنَاكُمْ وَاشْكُرُوا لِلَّهِ إِن كُنتُمْ إِيَّاهُ تَعْبُدُونَ (١٧٢) إِنَّمَا حَرَّمَ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةَ وَالدَّمَ وَلَحْمَ الْخِنزِيرِ وَمَا أُهِلَّ بِهِ لِغَيْرِ اللَّهِ فَمَنِ اضْطُرَّ غَيْرَ بَاغٍ وَلَا عَادٍ فَلَا إِثْمَ عَلَيْهِ إِنَّ اللَّهَ غَفُورٌ رَّحِيمٌ (١٧٣)﴾ [البقرة : ١٧٢ ، ١٧٣] .

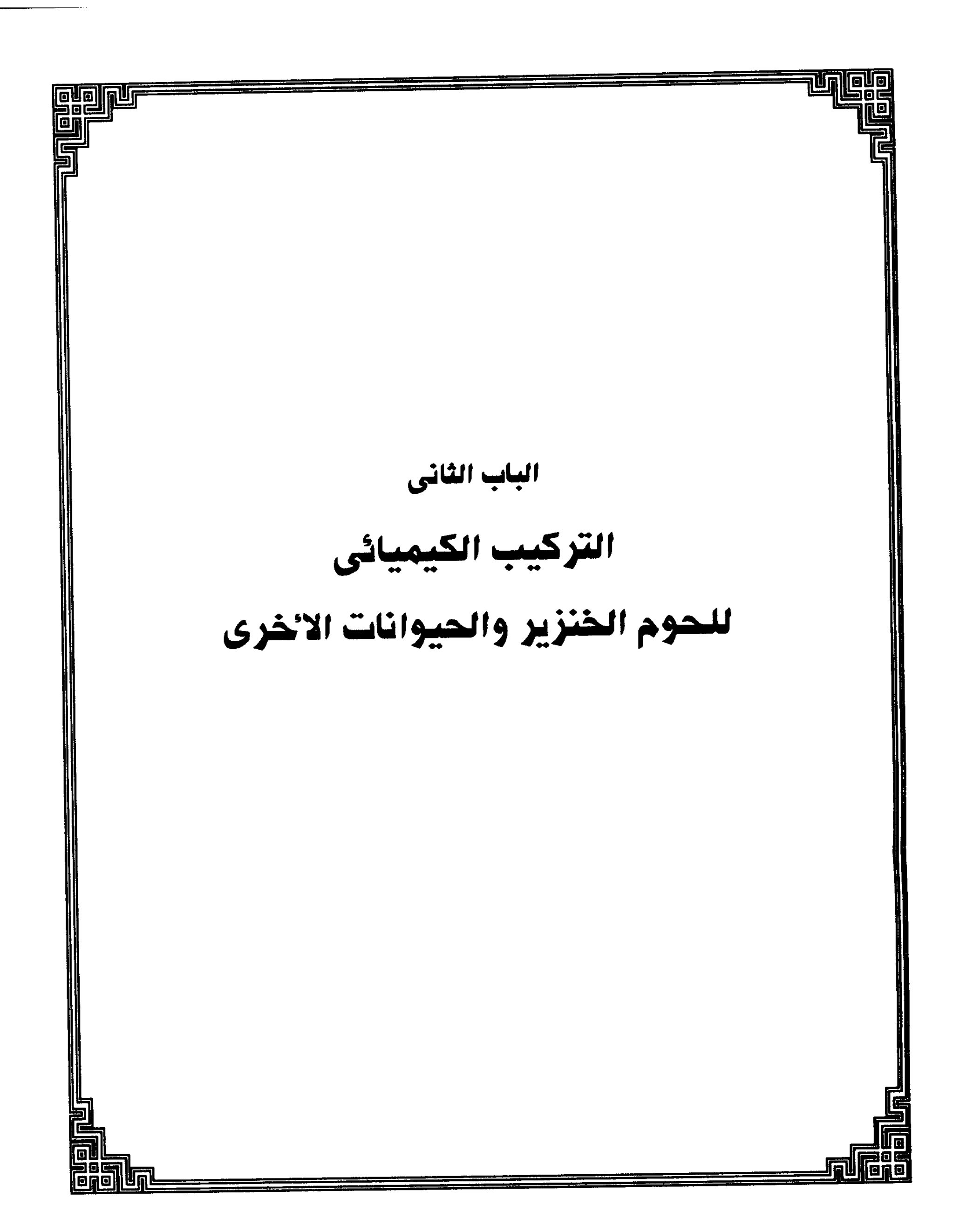
٢ - ويقول سبحانه وتعالى : ﴿حُرِّمَتْ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةُ وَالدَّمُ وَلَحْمُ الْخِنزِيرِ وَمَا أُهِلَّ لِغَيْرِ اللَّهِ بِهِ وَالْمُنْخَنِقَةُ وَالْمَوْقُوذَةُ وَالْمُتَرَدِّيَةُ وَالنَّطِيحَةُ وَمَا أَكَلَ السَّبُعُ إِلَّا مَا ذَكَّيْتُمْ وَمَا ذُبِحَ عَلَى النُّصُبِ وَأَن تَسْتَقْسِمُوا بِالْأَزْلَامِ ذَٰلِكُمْ فِسْقٌ الْيَوْمَ يَئِسَ الَّذِينَ كَفَرُوا مِن دِينِكُمْ فَلَا تَخْشَوْهُمْ وَاخْشَوْنِ الْيَوْمَ أَكْمَلْتُ لَكُمْ دِينَكُمْ وَأَتْمَمْتُ عَلَيْكُمْ نِعْمَتِي وَرَضِيتُ لَكُمُ الْإِسْلَامَ دِينًا فَمَنِ اضْطُرَّ فِي مَخْمَصَةٍ غَيْرَ مُتَجَانِفٍ لِّإِثْمٍ فَإِنَّ اللَّهَ غَفُورٌ رَّحِيمٌ﴾ [المائدة: ٣] .

٣ - يقول جل وعلا : ﴿قُل لَّا أَجِدُ فِي مَا أُوحِيَ إِلَيَّ مُحَرَّمًا عَلَىٰ طَاعِمٍ يَطْعَمُهُ إِلَّا أَن يَكُونَ مَيْتَةً أَوْ دَمًا مَّسْفُوحًا أَوْ لَحْمَ خِنزِيرٍ فَإِنَّهُ رِجْسٌ أَوْ فِسْقًا أُهِلَّ لِغَيْرِ اللَّهِ بِهِ فَمَنِ اضْطُرَّ غَيْرَ بَاغٍ وَلَا عَادٍ فَإِنَّ رَبَّكَ غَفُورٌ رَّحِيمٌ﴾ [الأنعام : ١٤٥].

٤ - ويقول تعالى : ﴿فَكُلُوا مِمَّا رَزَقَكُمُ اللَّهُ حَلَالًا طَيِّبًا وَاشْكُرُوا نِعْمَتَ اللَّهِ إِن كُنتُمْ إِيَّاهُ تَعْبُدُونَ (١١٤) إِنَّمَا حَرَّمَ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةَ وَالدَّمَ وَلَحْمَ الْخِنزِيرِ وَمَا أُهِلَّ لِغَيْرِ اللَّهِ بِهِ فَمَنِ اضْطُرَّ غَيْرَ بَاغٍ وَلَا عَادٍ فَإِنَّ اللَّهَ غَفُورٌ رَّحِيمٌ (١١٥)﴾ [النحل : ١١٤ ، ١١٥] .

(*) الامراض التى تنتقل من الخنازير ومنتجاتها إلى الإنسان يمكن الاطلاع عليها فى كتاب الأمراض التى تنتقل من الحيوانات ومنتجاتها إلى الإنسان وطرق الوقاية منها للدكتور محمد محمد هاشم - دار المعارف ٢٠٠٠ م .





الباب الثانى

التركيب الكيميائى
للحوم الخنزير والحيوانات الأخرى

الباب الثانى

التركيب الكيميائى للحوم الخنزير والحيوانات الأخرى

اللحم من أشهى المأكولات وألذها طعمًا ، اعتاده الإنسان من قديم الزمان وكان يأكله نيئا ، وحتى استطاع إيقاد النار فشواه وأصبح لا غنى له عنه ، ثم تعددت بعد ذلك طرق طهية .

اللحم عنصر أساسى ومغذ للجسم وغنى بالأملاح المعدنية كفوسفات البوتاسيوم والصوديوم والكالسيوم والماغنيسيوم والحديد وهو غنى أيضًا بالكبريت والنحاس والزنك والألومنيوم والكوبلت والمانجنيز .

واللحم أيضًا غنى بالفيتامينات مثل فيتامين «ب$_{٦}$» ، ب$_{١٢}$ والثيامين وريبوفلافين وحمض النيكوتين ك وحمض البانوثنيك وفيتامين «أ»، فيتامين جـ.

وأيضًا اللحوم تحتوى على عديد من الأنزيمات مثل أنزيم الليباز وأميلاز والمالتاز ، والفوسفاتاز ، كربوكسيلان والكاتيسين والبيروكسيداز ، واللحم غنى بالمواد الزلالية والبروتينات .

أما تركيب البروتينات فى اللحم فأقرب ما يكون إلى تركيب البروتينات الموجودة فى جسم الإنسان .

ويتركب اللحم من نسيج عضلى ونسيج ضام والنسيج العضلى يتركب من ألياف تختلف طولا باختلاف مكان وجودها فى الحيوان وهذه الألياف تتكون من مواد بروتينية .

أما النسيج الضام يتكون من اليومين وكلاجين التى تذوب فى الماء البارد وتتحول إلى جيلاتين عند القلى أو بإضافة حامض وكلما زاد عمر الحيوان قلت كمية الماء وزادت كثافة مادة الكلاجين .

ويوجد بين الألياف السابقة فى وسط النسيج الضام كميات من الدهن ، وهذا الدهن يقل فى بعض الحيوانات ويكثر فى الأخرى .

وأهم البروتينات التى فى هذه الألياف مادة تسمى ميوسين وهذه المادة تتجلط بعد موت الحيوان فتتصلب العضلات ولكنها تعود وتلين بعد مدة بتأثير بعض الخمائر وأهمها خميرة الببسين ، ويتكون داخل الأنابيب بعض الأحماض مما يساعد على الهضم ، ولكن إذا زادت المدة بعد موت الحيوان فإنه يحدث تحلل وتتغير رائحته وطعمه .

ويوجد داخل الأنابيب التى يتكون منها النسيج العضلى من اللحم عصارة، وهذه العصارة تحتوى على أملاح معدنية أهمها حمض الفوسفوريك وأملاح الكالسيوم والحديد التى تكسب اللحم اللون الأحمر وبعض الخلاصات التى تنفذ إلى الماء أثناء غليها وهذه الخلاصات هى التى تكسب اللحم نكهته .

البروتين يلعب دورًا هامًا فى حياة البشرية واللحم هو المصدر الأساسى للبروتين . ولعقيدتنا الإسلامية السمحاء تنهانا عن أكل لحوم الخنزير ومن هنا لزاما علينا أن نتعرف على الخواص الفسيولوجية للحم ودهن الخنزير ومنها الثقل النوعى ومعامل الانكسار ودرجة الانصهار ، الرقم الحامضى والمدلول البيروكسيد ورقم التصبن ، والرقم الأيودينى والرطوبة والبروتين والدهن والرماد . . . إلخ .

ونوجزها فى الجداول الآتية حتى يمكن التمييز بين أنواع اللحوم والدهون المختلفة .

جدول (١) يبين التركيب الكيميائى لعضلة اللونجسمس دورسى فى لحوم الحيوانات المختلفة . ويتبين من الجدول أن نسبة الماء فى لحوم الخنزير أقل من

الغنم والأرانب ومشابــهة للحوم ثور البقر . ونسبة الـدهون بين العضلات أقل فى لحوم الخنزير عنها فى الغنم وثور البقر وأعلى من الدهون الموجودة فى لحوم الأرانب . والرقــم الأيودينى فى لحــوم الخنزير أعلــى من الرقم الأيوديــنى فى الغنــم وأقل منه فى لحوم ثــور البقر والنســبة المئوية للـنيتروجين وثور الـبقر . ونسبة الميوجلــوبين فى لحوم الخنزير أقل بالمقارنة بالموجــود فى لحوم الغنم وثور البقر وأكبر من الموجود فى لحوم الأرانب Nour Eldin et al, 1984 .

الجدول (٢) يـبين التركـيب الكـيميائـى للحوم الـغنم والخـنزير الطـازجة والمأخوذة من أرجـل الحيوانات السابق ذكرهـا . ولقد لوحظ أن نسبـة الرطوبة والبروتين فـى لحم الغنم عالى بمـقارنته بلحم الخنـزير الذى يحتوى علـى نسبة أعلى مـن الدهون والاختـلاف بين دهن الغنـم والخنزير يتـناسب مع الـرطوبة الموجودة بهـما والاختلاف فى البروتين والـرماد ضئيل . ويستنـتج من الجدول أيضًا أن لحوم الخـنزير تحتوى عـلى دهن أعلـى ورطوبة وبروتين أقـل من لحم الغنم . ولحـم الغنم أقل فى الطـاقة الحرارية عن لحم الخنـزير وذلك لأن لحم الخنزير يحتوى على نسبة كبيرة من الدهن An Fimov et al, 1959, Pavlovski and Palmin 1963 .

جدول (١)

جدول يبين التركيب الكيميائى لعضلة اللونجيسمس دورسى (Longismis dorsi)

فى لحوم الحيوانات المختلفة

الخــــواص	الأرنب	الغنم	الخنزير	الثور
للماء	٧٧,-	٧٧,-	٧٦,٧	٧٦,٨
للدهون المــوجودة بين العضلات	٢,-	٧,٩	٢,٩	٤,٣
الدهون المــوجودة بين الــعــضلات (الــرقــم الأيودينى)	--	٥٤	٥٧	٥٧
للنيتروجين الكلى	٣,٤	٣,٦	٣,٧	٣,٦
للـفوسـفور الـقابـل للذوبان	٠,٢٠	٠,١٨	٠,٢٠	٠,١٨
ميوجلوبين	٠,٠٢	٠,٢٥	٠,٠٦	٠,٥٠

المصدر : Nour El - Din, et al, 1984

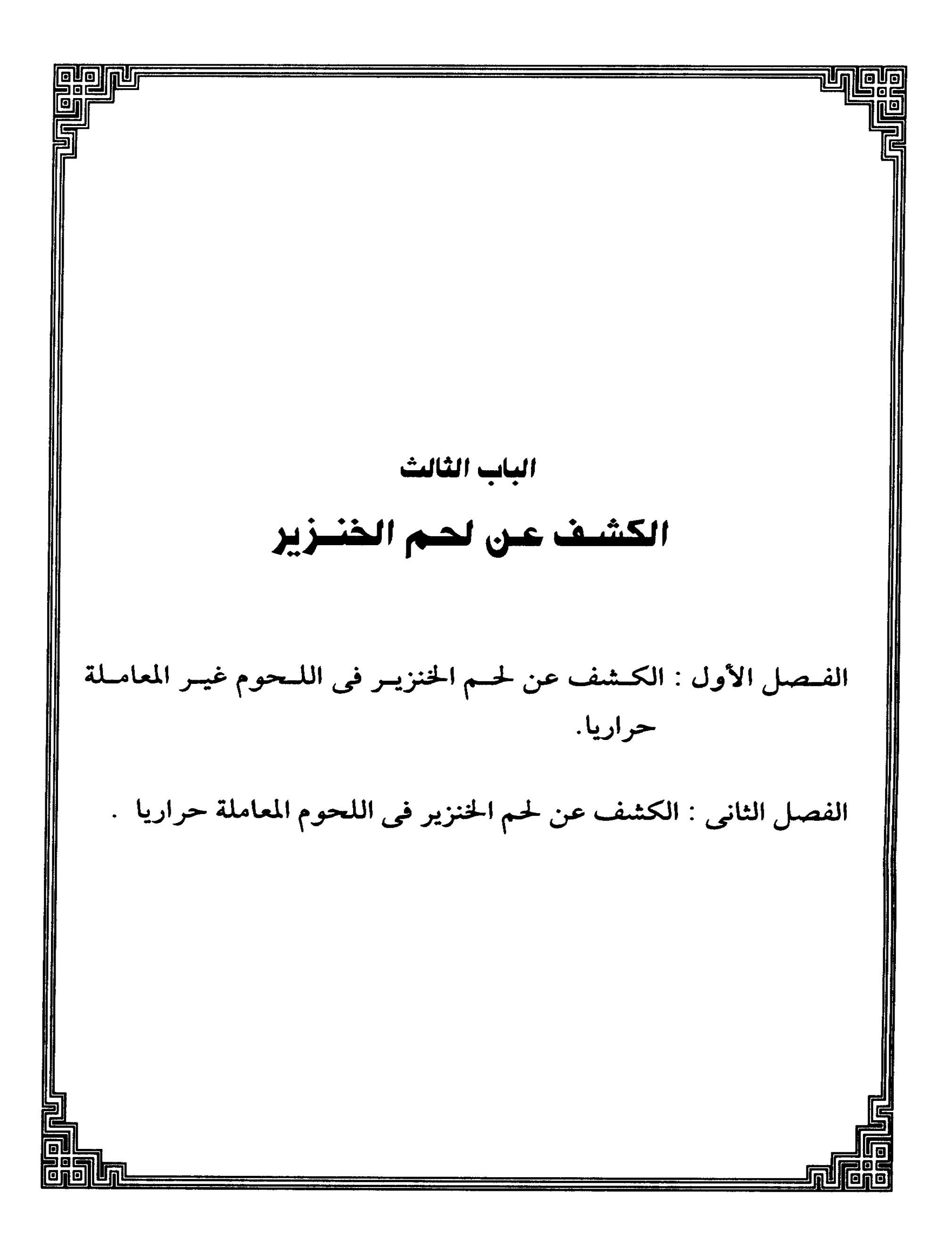
جدول (٢)

يبين التركيب الكيميائى للحوم الغنم والخنزير الطازجة

العناصـــــر	لحـــوم الغنـــم		لحـــوم الخنزيـــر	
	على أساس الوزن الطازج	على أساس الوزن الجاف	على أساس الوزن الطازج	على أساس الوزن الجاف
للرطوبة	٧٣,٧٥	–	٧١,٥٥	–
للبروتين	١٥,٧٥	٦٠,–	١٥,٣٥	٥٣,٩٥
للدهن	٨,٢١	٣١,٢٨	١٠,٨٥	٣٨,١٤
للرماد	١,٠٤	٣,٩٦	١,٠٦	٣,٧٣
للكربوهيدرات	١,٢٥	٤,٧٦	١,١٩	٤,١٨
للمواد الجافة	٢٦,٢٥	–	٢٨,٤٥	–
قيمة الطاقة	١٤٤,٤١	–	١٦٦,٥٥	–
(كالورى / ١٠٠ جرام)				

المصدر : Nour El - Din, et al, 1984





الباب الثالث

الكشف عن لحم الخنزير

الفصل الأول : الكشف عن لحم الخنزير فى اللحوم غير المعاملة حراريا.

الفصل الثانى : الكشف عن لحم الخنزير فى اللحوم المعاملة حراريا .



الفصل الأول

الكشف عن لحم الخنزير فى اللحوم غير المعاملة حراريا



الفصل الأول

الكشف عن لحم الخنزير في اللحوم غير المعاملة حراريا باستخدام طريقة كورتكس Cortecs الانجليزية(*)

أساس الطريقة :

تعتمد الطريقة على الخاصية المناعية للانزيم حيث يتم ارتباط جزيئات بروتين اللحم بطريقة الساندوتش . تفرم عينات اللحم جيدًا وتستخلص باستخدام المحلول الملحى ويضاف مستخلص اللحم المخفف إلى الحفر المجهزة والمغطاة بالأجسام المضادة المتخصصة . (وكلما زاد تركيز البروتين المراد الكشف عنه فى المستخلص كلما زادت الكمية الملتصقة منه بالأجسام المضادة بالحفرة) بعد الغسيل وإزالة الزائد من البروتين (البروتين غير المرتبط) . يضاف بعد ذلك أنزيم البيروكسيديز المرتبط بالأجسام المضادة المتخصصة ثم التحضين ثم الغسيل لإزالة الإنزيم الزائد . يكشف بعد ذلك عن الانزيم المرتبط بإضافة مادة التفاعل التى تظهر اللون الأزرق فى الحفر ثم بعد ذلك يضاف محلول إيقاف التفاعل الذى يحول اللون الأزرق إلى أصفر . ترتبط درجة اللون الأزرق بكمية البروتين المراد الكشف عنه فى مستخلص اللحم ويمكن الكشف عنه ومعرفة نوع اللحم بالفحص بالعين المجردة أو استخدام جهاز اسبكترو فوتوميتر أو بجهاز قراءة الحفر .

الكواشف :

- كلوريد الصوديوم .

(*) المصدر (Cortecs Dignostics 1994) .

- مجموعة الكواشف مركبة من :

أ - قارورة بها البيومين خاص لكل صنف من الحيوانات كمحلول ضابط إيجابى ، وتحتوى على ١,٨ مليمتر محلول فوسفات منظم بالألبيومين ، وبه حامل للبروتين ومادة حافظة تسمى ثيومرسال .

ب - أنبوب بها أجسام مضادة من الألبيومين خاصة لكل صنف من الحيوانات مرتبطة بانزيم البيروكسيديز ، تحتوى على ١,٨ مليمتر من الرابط المناسب للأجسام المضادة فى محلول الفوسفات المنظم كحامل للمصل ومادة حافظة تسمى ثيومرسال .

جـ - أنبوب بها ٦,٥ مليمتر من محلول كروماتوجين ت م ب (TMB) (3, 3, 4, 5 - Tetra methyl benzidine Dihydrochloride) .

د - أنبوب بها ٦,٥ مليمتر من المحلول المنظم ت م ب .

هـ - أنبوب تحتوى على ١٠٠ مليمتر من محلول الغسيل المركز يشمل عشرة أضعاف تركيز المحلول الملحى المحايد وبه المادة الحافظة ثيومرسال .

و - أنبوب تحتوى على ٢٠ مليمتر من حامض كبرتيك واحد م كمحلول إيقاف التفاعل .

تحضير مجموعة الكواشف :

أ - **محلول البروتين الإيجابى** لكل صنف من الحيوانات (توجد هذه الكواشف بحجم ٢ مليلتر لكل كاشف ضمن محتويات مجموعة الكواشف مخففة ولا تحتاج إلى تجهيز غير قلبها إلى أعلى وإلى أسفل بلطف عدة مرات مع تجنب الرج) .

ب - **محلول كروماتوجين** ت م ب (TMB) ومحلول التخفيف المنظم يخفف كاشف ت م ب بنسبة ١ : ١ باستخدام محلول التخفيف المنظم ويحضر الكاشف طازجا للعمل به بحيث يستخدم خلال فترة لا تزيد على ٤ ساعات

جـ - **محلول الغسيل المركز** بالماء المقطر ومنزوع الأيونات بنسبة $\frac{١}{١٠}$ حيث تضاف النسبة كما يلى ٩٦ حفره اختبار (١٠٠ مليلتر من محلول الغسيل المركز + ٩٠٠ مليلتر ماء مقطر منزوع الأيونات) فى قارورة حجمه أو مخبار زجاجى حفره (٤٩ مليلتر من محلول الغسيل المركز + ٢١٦ مليلتر ماء مقطر منزوع الأيونات) .

د - **تركيز المخفف نموذج ٣** يخفف هذا المحلول (الحجم الكلى ٢٠ مليلتر بنسبة $\frac{١}{٥}$ بالماء المقطر أو منزوع الأيونات حيث تحتاج ٩٦ حفره إلى كل المحلول (٢٠ مليلتر) ويكمل بالماء المقطر أو منزوع الأيونات إلى ١٠٠ مليلتر ، ٤٨ حفره تحتاج إلى ٩,٥ مليلتر + ٣٨ مليلتر ماء مقطر أو منزوع الأيونات و ٢٤ حفره تحتاج ٤,٥ مليلتر + ١٨ مليلتر ماء مقطر أو منزوع الأيونات يستخدم هذا المحلول فى عمل التخفيف النهائى بنسبة ١ : ٩ لمستخلص اللحم .

و - محلول إيقاف التفاعل لا يحتاج هذا المحلول إلى تخفيف (حجمه ٦ مليلتر) ويكفى مزجه جيدًا بالقلب إلى أسفل وإلى أعلى . (هذا المحلول سام ويجب الحرص من ملامسته للجلد وإذا لمس الجلد يغسل جيدًا مكان التلامس بكمية وافرة من الماء المباشر .

تحضير واستخلاص عينات الاختبار :

محلول الاستخلاص :

هو محلول ملحى (٩, ٠ مجم كلوريـد صوديوم + ١٠٠ مليلتر ماء مقطر منزوع الأيونات) يستخدم فى استخلاص عينات اللحوم . ويمكن استخدام الماء العادى للاستخلاص إذا استدعت الضرورة .

تحضير عينات الاختبار :

تستخدم اللحـوم المفرومة مباشرة فى الاستخلاص أما عيـنات قطع اللحوم المجمدة لابد أن تفرم إلى قطع صغيرة دقيـقة جدًا ومطحونة وممزوجة جيدًا قبل الاستعمال ويفضل أن تكون العينة مفرومة جيدًا ومتجانسة لتعطى نتائج أفضل.

استخلاص عينات الاختبار :

- من حسـاسية التجربـة لابد أن يلاحظ تجنب الـتلوث من عينـة إلى أخرى وكـذلك يستحسـن غسـل الأدوات جيـدًا قبـل استعمالها فى الاستخلاص (يفضل الغسيل للأدوات جيدًا بالماء والصابون وتجفف) .
- يوزن واحد جرام من عينـة اللحم وتوضع فى أنبوبة مدرجة نظـيفة سعتها ١٠ مليلتر وذات سدادة .
- يكمل الحجم فى الأنبوبة إلى ١٠ مليـلتر بالمحلول الملحى أو الماء فى حالة الضرورة ثم تغلق الأنبوبة وترج جيدًا باليد أو على جهاز هز مناسب وتترك لمدة ١٠ دقائق .

ملحوظة : اعتمادًا على طبيعة وحجم العـينة المراد الكشف عنها توضع فى وعاء مناسب ويضاف إليها المحلول الملحى .

- يظهـر سائل رائق على عـينة اللحـم يجهز محـلول مخفف بنـسبة ١ : ٩ يؤخذ ١, ٠ مليلتر من السائل الرائق لعينة اللحم ويضاف إليها ٩, ٠ مليلتر من محلول المجهز (الموجود فى تحضير مجموعة الكواشف S) .

ملحوظة : إذا كانت العينة بها نسبة عالية من الدهن يسحب من المستخلص الملحى كمية من الجزء المائى بماصة باستير وتوضع فى أنبوبة نظيفة ثم يؤخذ منها الكمية التى سيجرى تخفيفها .

الأجهزة والأدوات :

- وحدة قياس الحفر الصغيرة فى شرائط بلاستيكية وتختص كل منها بأجسام مضادة لكل صنف من الحيوانات وتحتوى على ١٢ شريط منفرد كل شريط به ٨ حفـر أى عدد كل الحفر ٩٦ حفرة والاثنى عشر شريـط موضوعة فى إطار من الـبلاستيك ومعـبأة فى كيس من الـرقائق البلاسـتيكية المبـطنة . أعماق الحفر مغطاة مسبقا من الـداخل بكمية محدودة من الأجسام المضادة لكـل صنـف معـين من الحـيوانات ويـوجد داخـل الكـيس قـرص ماص للرطوبة .
- خلاط ومفرمة لحم .
- ماكينة غسيل خاصة لغسل الحفر البلاستيكية .
- ماصات صغيرة سعة ٥٠ ، ١٠٠ ميكرولتر .
- جهاز موجة الجهاز ٤٥٠ نانومتر .
- وحدة قياس من الحفر البلاستيكية الـصغيرة بها أجسام مضادة لكل صنف من الحيوانات عـند العمل بفتح الكـيس بقصة من مكان القـفل على طول الحافة المـعرجة ثم يسـحب الإطار المحتوى علـى الشرائط والمحتـوى على

الحفر المطلوبة وتثبت فى إطار آخر غير الموجود بالكيس وتترك باقى الأشرطة داخل إطارها الذى كانت فيه وتعبأ مرة أخرى فى الكيس مع القرص الماص للرطوبة ثم يغلق بشريط لاصق .

ملحوظة : الكواشف التى فتحت للعمل بها يمكن وضعها فى الثلاجة عند درجة حرارة ٢ - ٨° س للحفاظ على صلاحيتها .

طريقة العمل :

١- تؤخذ الكواشف وكيس الشرائط من الثلاجة وتترك حتى تصل درجة حرارة الغرفة .

٢ - تحضير مستخلصات اللحوم ومجموعة الكواشف .

٣ - بالماصة الميكرولترية يوضع ١٠٠ ميكرولتر من كل من المحلول الضابط الإيجابى (مستخلصات العينات المخففة) فى الحفر المناسبة لكل منها مع ملاحظة استخدام ماصة جديدة لكل نوع لمنع التلوث .

٤ - توضع الشرائط وهى داخل إطارها على جهاز الهز لمدة ساعة .

٥ - يجرى الغسيل ٥ مرات باستخدام جهاز الغسيل ثم يجفف سطح الشرائط بورق تجفيف بالضغط على وسط الإطار لكى يمسك الإطار ثم إيقلب على ورق التجفيف لكى يزال نقط الغسيل من الحفر .

٦ - باستخدام ماصة ميكرولترية يضاف ٥٠ ميكرولتر من الأجسام المضادة لألبيومين الخنزير المرتبط بإنزيم البيروكسيديز لكل حفرة من الحفر الخاصة بالحيوانات الأخرى تغيير الماصة كل مرة .

٧ - توضع الشرائط وهى داخل إطارها على جهاز الهز لمدة ١٠ دقائق .

٨ - يكرر الغسيل كما فى خطوة رقم ٥ السابقة .

٩ - يضاف باستخدام ماصة ميكرولترية ١٠٠ ميكرولتر من محلول ت م ب لكل حفرة .

١٠ - توضع الشرائط وهى داخل إطارها على جهاز الهز لمدة ١٠ - ٢٠ دقيقة .

١١ - يضاف باستخدام ماصة ميكرولترية ٥٠ ميكرولتر من محلول إيقاف التفاعل (اللون يغير من الأزرق إلى الأصفر) .

١٢ - يتم الخلط لمدة ١٠ ثوانى على جهاز الهز .

١٣ - بجهاز قراءة الحفر البلاستيكية يقاس الامتصاص خلال فترة لا تزيد على ٦٠ دقيقة من إضافة محلول الإيقاف عند طول موجة ٤٥٠ نانومتر لكل حفر الاختبار .

طريقة التحليل الكمى :

وجد من المستحسن حساب القيمة المحددة كحد فاصل بين النتائج الإيجابية والسالبة وتسمى القيمة الحدية وهى أكثر دقة من التقييم بالعين المجردة .

ولحساب القيمة الحدية يؤخذ متوسط الامتصاص للعينات السالبة مضروبا فى العامل ف (قيمة ف هى ٢,٥) .

وإذا كانت قيمة الاختبارات للعينات أكبر من القيمة الحدية تعتبر النتيجة إيجابية .

ملحوظة : قيمة ف تختلف تبعًا لجودة الكواشف وطريقة استخلاص العينة من مختبر لآخر من صنف حيوان لآخر (لذلك يستحسن حساب قيمة ف قبل إجراء الاختبار) .

هذا الاختبار صمم علـى أساس أن العينات الموجبة تعطـى لون إيجابى عند تركيز لحـم أحمر طازج ٣ - ٧ ٪ وعلى هذا فإن العينـات ذات تركيز لحم أحمر ١٠٠ ٪ تعطى لون أشد فى التجربة وقد وجد أيضًا أن هذا الاختبار يعطى نتائج إيجابية حتى ٠,١ ٪ .

ولتقدير قيمة ف الخاصة بكل نوع يحضر مستخلص لحم أحمر تركيز $\frac{١}{١٠٠}$ أى يؤخذ من المحلول الملحى الرائق فوق عينة اللحم ٠,١ مليمتر ويضاف إليها ٩,٩ مليمتر من المحلول المخفف (المـوجودة فى مجموعة الكواشف S) عند اختبار هذا المحلول فإنه يعطى قيمة إمتصاص مساوية تقريبًا للقيمة عند استخدام ف = ٢,٥ وإذا حصلنا على إمتصاص مختلـف عن القيمة الحدية عند استخدام ف = ٢,٥ فإنه يتـعين إعادة الحساب لكل نوع لاسـتخراج قيمة ف المنـاسبة من المعادلة التالية :

$$\text{ف} = \frac{\text{القيمة المئوية لإمتصاص العينة الموجوبة}}{\text{متوسط قيمة إمتصاص الصفات السالبة}}$$

ومن قيمة ف الناتجة تحسب القيمة الحدية المناسبة

القيمة الحدية = ف × متوسط الامتصاص للعينة

ملخص خطوات العمل

الطريقة	الحجم	الوصف
يضاف	١٠٠ ميكرولتر	من المحلول الضابط الإيجابى أو من مستخلصات العينة داخل الحفر البلاستيكية .
تحضين	--	لمدة ٦٠ دقيقة عند درجة حرارة الغرفة .
غسيل	--	يغسل كل الحفر البلاستيكية ٥ مرات بمحلول الغسيل .
يضاف	٥٠ ميكرولتر	من مضاد الألبيومين المرتبط بإنزيم البيروكسيديز فى كل حفر .
تحضين	--	لمدة ١٠ دقائق فى درجة حرارة الغرفة .
غسيل	--	تغسل الحفر البلاستيكية ٥ مرات بمحلول الغسيل .
يضاف	نقطة/ ٥ ميكرولتر	من محلول الإيقاف فى كل الحفر واخلط لمدة ١٠ ثوان .
قياس الامتصاص		يقاس الامتصاص لكل حفرة مستخدمًا جهاز قراءة الامتصاص (يجب أن تكون طول موجة الجهاز ٤٥٠ نانومتر عند القراءة) أو بجهاز سبكتوفتومتر .

الكشف عن أنواع اللحوم غير المعاملة حراريا باستخدام نظام اليسا ALISA المتبع فى المعمل البيطرى الإقليمى بمدينة بيتالا باستراليا ١٩٨٣(*)

أساس الطريقة :

تعتمد هذه الطـريقة على إجراء اختبار مناعى بإضافـة الكشاف الخاص بنوع معين من اللحم (يحتوى على الأجسام المضادة (antibodies) لهذا اللحم) إلى مصل أو مستخلـص عدة أنواع من اللحوم أو منتجاتها كـل على حدة (يحتوى كل منها عـلى المواد المولدة للأجسام المـضادة لكل نوع Antigens حيث يحدث نوع من الارتباط بـين جزيئات النوع المقابـل له من مصل اللحم أو مـستخلص المنتج المناسـب فقط ولا يحدث إرتباط مع باقى الأنـواع الأخرى من اللحوم أو منتجاتها وعليه عند إضافة كشاف اللون والذى يعطى لون أزرق فى حالة وجود جزيئات مرتبطة فقط (antibody مع antigen) يمكن التعرف عـلى نوع اللحم الموجود بـالعينة . وكشـاف اللون ما هو إلا مادة تـفاعل subtrate يعمل عليها أنزيم معين سبق ربطه بالأجسام المضادة المضافة فى صورة الكشاف الخاص بنوع اللحم حـيث يحول هذا الإنزيم مادة التـفاعل من سائل عديم اللـون إلى سائل أزرق .

مميزات هذه الطريقة :

- تكشف هذه الطريـقة على ثمانية أنواع من اللحـوم وهذه الأنواع هى البقر والغنم والخنزير والحصان والكانجارو والماعز والجاموس والحمار .

(*) المصدر (Carnegie et al 1983) .

- طريقة سريعة تحتاج إلى ٩٠ دقيقة تقريبًا .
- تظهر النتيجة إيجابية فى وجود المصل أو الدم أو البلازما أو السيرم فى مستخلص العينة ولو بتركيزات منخفضة حتى ١ ٪ تقريبًا .

الكواشف :

- **الكواشف الخاصة باللحوم** : سوائل ذات لون بنفسجى يميل إلى الزرقة معبأة فى عبوات بلاستيكية صغيرة كل عبوة تحتوى على الكشاف الخاص بنوع معين من اللحم وعلى طرفها قطارة للتنقيط ومغطاة بغطاء ذو لون مميز مماثل للون البقعتين اللونيتين الموجودتين على جانبى الصف الأفقى المخصص لاختبار نفس النوع من اللحم على شريحة الكشف .
- **كشاف اللون**: سائل عديم اللون معبأ فى عبوة أو أكثر مماثلة لعبوات الكواشف الخاصة ومغطاة بغطاء أبيض وعند استخدامه يظهر لون أزرق مع أى نوع من أنواع اللحوم فى حالة وجود هذا النوع فى العينة .
- **محلول الغسيل** : يحضر بإضافة حجمين من المحلول المركز الموجود بالعبوة البلاستيكية ذات الفتحتين إلى عبوة محلول الغسيل الفارغة النظيفة ويتم التخفيف بالماء إلى نهاية العبوة . يتم الحصول على كل حجم من هذين الحجمين بإزالة غطاء الجزء العلوى الصغير من العبوة ذات الفتحتين ثم الضغط الخفيف على الجزء السفلى الكبير حتى تمام إمتلاء الجزء العلوى الذى يمثل حجم واحد . المحلول المحضر يظل صالحا لعدة أسابيع تحت ظروف التبريد .

الأجهزة والأدوات :

شريحة الكشف : شريحة بلاستيكية مستطيلة ٨ × ١٢ سم بها ١٢ صف

رأس من الحفر العميقة كل صف به ثمانية حفر ، وهذه الصفوف متجاورة أفقيا بحيث تكـون الحفر الموجودة بها صفـوف أفقية كل صف أفقى يمـثل نوع واحد من اللحم كذلك فإن كل صف مميز على جانبى الشريحة ببقعة ذات لون خاص هو نفس لون غطاء عبوة الكشاف الخـاص بنوع اللحم المخصص له هذا الصف وذلك لتلافى الخـطأ وتسهيل العمل عـند التنفيذ وليس لـهذه الألوان أى علاقة باللون الذى يظهر عنـد الحصول على نتائج إيجابية لأن النتيجـة الإيجابية تعطى لونا أزرق مع جـميع أنواع اللحوم (انـظر الشريحة المـبينة بالشكـل) الصفان الرأسيان رقم ٥ ، ١١ يحتوى كل منهما على ثمانية حفر قياسية .

كل حفـرة مجهزة مـسبقًا بالنـوع الخاص بها مـن اللحوم أى أنـه لا يصح إضافة أى عينة إليها ولكن يضاف إليـها فقط الكشاف الخاص بها وكشاف اللون فإذا ظهر بـها اللون أزرق دل ذلك على صـلاحية الكشاف والشـريحة وإذا لم يظهر أو ظهر باهـتا دل ذلك على انتهاء الصلاحية ، أو إقتراب إنـتهائها . باقى الصفـوف الرأسـية ١ ، ٢ ، ٣ ، ٤ ، ٦ ، ٧ ، ٨ ، ٩ ، ١٠ ، ١٢ فـارغة ويمكن اختـبار العينات بهـا بحيث يستخـدم كل صف لعينة واحـدة . فى حالة الـرغبة فى عمل اختبـار ضابط فقد تم تخصيـص الصفين ٦ ، ١٢ لذلك وفى هذه الحالة لا يضاف إليهما أى عينة ولكن يضاف الكواشف وكشاف اللون فقط والمفروض ألا يعـطى الضابط أى لون فـى أى حفرة وإذا أعطى لونًا يـعنى هذا تسرب آثار من أى عينة أو فساد وتلوث الكـواشف الخاصة جميع على الشريحة مغطاة بطبقة من البلاستيك تنزع عند الاستخدام .

قطارة : ماصة ذات طرف رفيع والطرف الآخر مثبـت به فقاعات بلاستيكية لتسهيل السحب والتقطير .

طريقة العمل :

- **تحضير العينة** : عينات اللحم غير المطبوخ أو منتجاته تستخلص بالنقع فى ماء مقطر أو ماء صنبور نظيف أو محلول الغسيل لمدة ٣٠ دقيقة تقريبا أو ترج فى كيس بلاستيك لمدة عشرة دقائق . العينات الجافة أو الدهنية قد تحتاج إلى وقت أطول ولا يهم التركيز ولكن يجب ألا يقل حجم سائل النقع عن وزن العينة تقريبًا ويمكن إجراء الاختبار على الدم الكامل أو المجفف أو السيرم أو البلازما كذلك أثبتت التجارب الأولية فى المختبر الغذائى بالهيئة العربية السعودية للمواصفات والمقاييس أن مستخلص عينات الدهن الحيوانى غير المعامل حراريا (عينات من المناطق الدهنية الخالصة فى جسم الذبيحة الخالية من أى لحم) تعطى نتيجة إيجابية مع اختلاف طريقة الاستخلاص حيث يتم خلط العينة جيدًا مع نصف وزن العينة من الماء أو محلول الغسيل فى خلاط ثم الترشيح واستخدام الراشح فى الاختبار وعموما فإنه يوصى فى جميع الحالات بألا يقل تركيز مستخلص العينة عن ١ ٪ .

- **إضافة المستخلص إلى شريحة الاختبار** : تزال الطبقة البلاستيك فوق الصفوف الرأسية المراد استخدامها تبعًا لعدد العينات التى ستختبر وذلك باستخدام مشرط ثم تقطر نقطتين من كل عينة فى كل حفرة من الثمانية حفر فى الصف الرأسى المخصص لها أى أن العينة الأولى تقطر فى الصف الرأسى الأول المخصص لها والعينة الثانية فى الصف الرأسى الثانى وهكذا وذلك باستخدام القطارة . وكما سبق شرحه لا يجب إضافة العينة للصفين ٥ ، ١١ القياسيين كما لا يجب إضافة العينة للصفين ٦ ، ١٢ إذا أريد استخدامهما كضابطين للاختبار ولكن فى حالة عدم الرغبة فى عمل ضابط فيمكن استخدام الصفين ٦ ، ١٢ كباقى الصفوف المخصصة لاختبار العينات . بعد الانتهاء من إضافة العينات إلى الحفر تغطى الشريحة بغطاء واقى مناسب نظيف جاف مثل

لوح من البلاستيك أو الزجاج أو الورق المقوى وتترك ٣٠ - ٦٠ دقيقة .

- **الغسيل الأول للحفر المستخدمة** : يرفع الغطاء من على الشريحة ويقذف ما بها من سوائل بسرعة بقلبها ونطرها بشدة ثم تغسل الحفر المستخدمة بملئها تمامًا بمحلول الغسيل وهزها قليلا ثم قذف المحلول فى كل مرة وبعد المرة الثالثة يصفى ما بقى فى الحفر بخبط الشريحة عدة مرات مقلوبة فوق ورق تخفيف ناعم ويجب أن تتم الثلاثة مرات غسيل خلال ٣٠ ثانية .

- **إضافة الكواشف الخاصة بأنواع اللحوم** : يضاف نقطتين من كل كاشف فى كل حفرة من الحفر المستخدمة والحفر القياسية والضابط بحيث يستخدم كل كشاف فى الصف الأفقى المخصص له بالضبط تبعًا للون غطاء عبوة الكشاف المماثل للبقعتين اللونيتين على جانبى الصف الأفقى أى أن التقطير هنا سيكون أفقيا كل كشاف فى الصف الأفقى المناسب له بعكس تقطير العينة الذى يتم رأسيا كل عينة فى صف رأسى وبهذا يتم إضافة الثمانية أنواع من الكشافات إلى العينة الواحدة كل كشاف فى حفرة من حفر العينة يراعى الدقة الشديدة أثناء التقطير بحيث لا تصل أى آثار من الكشاف فى غير المكان المخصص له وإن يتم التقطير فى وسط الحفرة وألا يلامس طرف القطارة أى جزء من الشريحة أو يتناثر منه أى رزاز عليها . تغطى الشريحة بغطاء واقى بعد نهاية التقطير كما سبق وتترك فى درجة حرارة الغرفة ٣٠ - ٦٠ دقيقة .

- **الغسيل الثانى للحفر المستخدمة** : يتم كما سبق ذكره .

- **إضافة كشاف اللون** : يضاف نقطتين لكل حفرة من الحفر المستخدمة ثم تغطى الشريحة بغطاء واقى وتترك فى درجة حرارة الغرفة ١٠ - ٢٠ دقيقة .

تحديد نوع اللحم بالعينة :

تفحص الثمانية حفر الموجودة فى كل صف رأسى وهى التى تمثل عينة

واحدة حيث يظهر السائل الموجود فى حفرة أو أكثر بلون أزرق وتبقى باقى الحفر فى الصف عديمة اللون يحدد نوع اللحم أو اللحوم الموجودة بالعينة تبعًا لأماكن الحفر التى أعطت اللون الأزرق وما يقابلها أفقيا فى ترتيب أنواع اللحوم كما هو مبين فى شكل الشريحة . فمثلا لو كانت العينة قطرت فى الصف الرأسى رقم ١ وظهر اللون الأزرق فى الحفرة الأولى من أعلى دل على وجود لحم خنزير أى أن العينة بها خليط من البقر والخنزير وإذا ظهر اللون الأزرق فى حفرة واحدة من الثمانية حفر فى الصف وكانت مثلا الحفرة الثانية دل على أن العينة تحتوى على لحم غنم فقط وهكذا . يلاحظ أن جميع الحفر القياسية فى الصفين ٥ ، ١١ فى حالة استخدامهما تعطى لونًا أزرق فى حالة صلاحية الشريحة والكواشف كما أن جميع حفر الضابط فى الصفين ٦ ، ١٢ لا تعطى أى لون فى حالة عمل ضابط ولكن إذا استخدم هذين الصفين فى الكشف عن العينات فإنهما تعطى اللون فى الحفر المقابلة لنوع اللحم الموجود بهذه العينات كما يحدث فى الحفر العادية . يتحول اللون الأزرق عادة إلى حبيبات مترسبة سوداء بعد عدة ساعات .

التخزين :

تحفظ الشرائع والكواشف فى التبريد عند عدم الاستعمال حيث تظل صالحة لمدة ٤ - ٦ شهور على الأقل .

الاحتياطات :

- يجب إجراء عملية الغسيل جيدًا كما ورد بالضبط وخاصة الغسلة الثالثة .
- فى حالة حدوث خطأ ووصول أحد الكواشف الخاصة إلى حفرة غير مخصصة له تعاد العينة التى حدث فى حفرتها الخطأ .

Microtiter plate

التعرف على انواع اللحوم باستخدام طريقة جهاز الكروماتوجراف السائل ذو الاداء العالى لتحليل هيستيدين ثنائى الببتيدات انسرين - كارنوسين . بالنين فى اللحوم الطازجة

كادنيجى . اليك . إثيردج وكولين

مدرسة الزراعة - جامعة لاتورب بيوتروورا باستراليا ١٩٨٣(*)

أساس الطريقة :

هو استخدام طريقة جهاز الكروماتوجراف ذو الأداء العالى (HPLC) باستعمال عمود بارتيزيل ١٠ SCX لتعيين نسبة الهيستيدين ثنائى الببتيرات الموجودة فى اللحوم والتى تساعد فى التعرف على نوع اللحوم المستخدمة فى منتجات اللحوم المصنعة وهذه الببتيرات هى انسرين (بيتا الانيل - ١ - مثيل هيستيدين) بالينين (بيتا الانيل - ٣ - مثيل هيستيدين) وكارنوسين (بيتا الانيل هيستيدين) .

وهذه الطريقة لها سلبيتان :

أولاً : استخدام محلول محايد من السيترات عند درجة حرارة ٥٠° س والتى تتلف عمود البارتيزيل ١٠ SCX المكون من كبريتات السيليكا .

ثانيًا : هذه الطريقة تحتاج إلى زاوية انحدار خاصة للإزاحة والتى تتطلب أدوات أكثر لإيجاد توازن بين مراحل التجربة .

(*) المصدر : (Carnegie et al 1983) .

الأجهزة والكواشف والمواد :

- عينات لحـوم الخنزير والحيوانـات الأخرى مثل الأرانب والدواجـن والبقر والغنم والخيول والحميـر والكنجارو والماعز وحوالى الغنم لتعـيين الباليتين والانسرين والكانوسين .
- محلول الكاشف (٥ فثالدياهيد (OPA)).
- جهاز الكروماتوجراف السائل ذو الأداء العالى .
- عمود بارتيزيل ١٠ SCX ٢٥ سم × ٤,٥ مليمتر .
- خلاط سورفال أومنى ذو ٨٠٠٠ لفة فى الدقيقة .

طريقة العمل :

١ - استخلاص ثنائى الببتيرات :

يوضـع فى خلاط سوفـال أومنى ٨٠٠٠ لـفة فى الدقـيقة ٣٠ جرام لحم أحمـر ، ٣٠ ملـيلـتر ٠,٩ ٪ محـلول ملـحى ، ١٢٠ مـليلـتر ٨ ٪ حمض سلفوساليسيلك (5 sulpho salicylicasid) ويخلط جـيدًا ثم يوضع فى أنـابيب جـهاز الطرد المركزى ويـدور عند ١٠,٠٠٠ لـفة فى الدقيقـة عند ٥° س لمدة ساعة . يؤخذ السائـل الطافى ويرشح بورق ترشـيح ذو مسام ٠,٢٢ ميـكرمتر قبل وضعـه فى جهاز الكرومـاتوجراف السائل ذو الأداء الـعالى لتحلـيله . ثم يؤخذ الراشح ويوضـع فى أنابيب جهاز الطرد المركـزى ويدور عند ٨٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة أربعة دقائق ونصف .

٢ - جهاز الكروماتوجراف :

يوضع ٥ ميكرولتـر من مستخلص الببتيدات فـى عمود بارتيزيل ١٠ SCX

مع محلول فورمات الليثيـوم المحايد المحتوى على ٢,٠ إم هيدروكسـيد الليثيوم المعاير عـند أس هيدروجـينى ٢,٩ بـحمل الفـورميك ويكـون سير العـمل فى العمود عند درجة حرارة ٤٠° س ومعدل إنسياب ٧,٠ مليلـتر فى الدقيقة من المضخة المائية . يخلط المزاح بـالكاشف (٥ - فثالدياهيد (OPA)) عند معدل إنسياب ١,٢ مليلـتر/ دقيقة بمضخة ذات ضغط عالى مـع ملاحظة أن الكاشف حساس لدرجة الحرارة المرتفعة . ثم بعد التـفاعل يغمس العمود فى حمام مائى درجة حرارته ٣٠° س ثم تعين مشتـقات ثنائى البتيدات بواسـطة جهاز كاشف فـلورسـنتى مـائى مـوديل ٤٢٠ والمحلول الـذى يخـرج من جهـاز الكـاشف الفلـورسنتى يكمـل مكانه أتوماتيـكيا بجهاز هـولت باكارد ٣٣٩٠ م ووجد أن تركيز ثنائى البيتيدات الفردية هى ٠,٠٥ إلى ٧ ميكرومول لكل جرام لحم .

النتائـج كما هو موضح بالـرسم الآتى والذى يبين تحلـيل هيستيديـن ثنائى اللبتيدات فى مختلف لحوم الحيوانات .

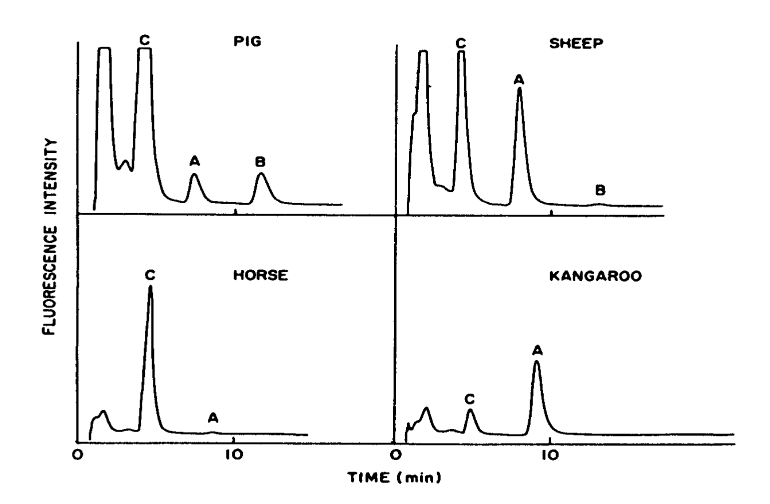


Fig. 1. Typical results of analysis of histidine dipeptides in meat samples from various species. Sparation was on a Partisil - 10 SCX column with 0.2 M lithium formate pH 2.9 at 40° C under isocratic conditions with post-column derivatization with OPA. For the pig and sheep 5 μl of the extract were applied and for the horse and kangaroo samples the extract was diluted ten-fold and five-fold, respectively. The flgure was prepared from the output of a Hewlett-Packard integrator. Peaks: A = anserine; C = carnosine; B = balcnine.

ووجد أن جهاز الكروماتوجراف السائل ذو الأداء العالى يفصل الهيستيدين وكارنوسين وأنسورين وبالنين بوضوح تام وقيمة التحليل للهيسنتيدين الكلى أو الفردى هى ± ٣ ٪ ، ± ٥ ٪ على التوالى .

وتعتبر طريقة جهاز الكروماتوجراف السائل ذو الأداء العالى أفضل من جهاز تحليل الأحماض الأمينية لتعيين الكارنونسين وذلك لمداه الأوسع فى التحليل .

وتركيز ثنائى الببتيدات فى اللحوم بعد الذبح ومخزنة تخزينًا سليمًا لا يوجد أى اختلاف أو اختلاف بسيط لا يذكر فيها .

فى بعض أنواع اللحوم للحيوانات المختلفة يوجد اختلاف فى تركيز الهيستيدين ثنائى الببتيدات الكلى فمثلا فى لحم الخنزير . نجد أن تركيز الأنسودين والبالنين تختلف من جزء لآخر فى جسمه .

وكما هو موضح بجدول رقم (١) نجد أن الجدول يبين تركيز الهيستيدين ثنائى الببتيدات فى مختلف أنواع لحوم الحيوانات وكذلك مبينًا الانحراف المعيارى الكبير الذى بدوره يبين الاختلاف فى أنسجة الحيوانات فى نفس النوع وكذلك الاختلاف فى كمية الانسورين والكاونوسين فى لحوم الحيوانات المختلفة والذى يوضح نوع لحوم الحيوانات .

جدول رقم (١)

يوضح كمية الهيستيدين ثنائى الببتيدات فى مختلف أنواع اللحوم

نوع لحوم الحيوانات	ثنائـــى الببتيــــدات				انسرين : كارنوسين : بالنين
	مجموع	انسرين	كارنوسين	بالنين	
الخـــنزير	١٣,٦ (٥,٣)	٠,٦٦ (٠,٠٨)	١٢,٢ (٤,٩)	٠,٧٥ (٠,٣٨)	(1 : 18.4 : 1.1) ١,١ : ٤,١٨ : ١
البقـــر	١٧,١ (٣,٦)	٢,٣ (٠,٤)	١٤,٧ (٣,٣)	٠,٠٧ (٠,٠٣)	(1 : 5.4 : 0.03) ٠,٠٣ : ٤,٦ : ١ 1 : 7.5 : 0.1
الجاموس	١٨,٢ (٤,٢)	٢,١ (٣,١)	١٥,٩ (١,٢)	٠,٢	٠,١ : ٥,٧ : ١ (1 : 0.3 : 0.0)
الماعـــز	١٠,٧ (٤,٢)	٨,٤ (٣,١)	٢,٣ (١,٢)	صفر	١ : صفر ,٣ : صفر صفر
حولى الغنم	٩,٩ (٣,١)	٤,٩ (١,٥)	٤,٩ (١,٧)	٠,١ (٠,١)	(1 : 1.0 : 0.02) ١ : ١, صفر : ٠,٠٢
الغنـــم	١٦,٨ (٣,١)	٨,٣ (٢,٢)	٤,٨ (١,٣)	٠,١ (,٠٣)	(1 : 1.1.0.01) ١ : ١,١ : صفر و ٠١,
الخيـــل	١٨,٠ (٦,١)	٠,٢ (٠,٠٤)	١٧,٨ (٦,٤)	صفر	(1 : 89 : 0.0) ١ : ٨٩ : صفر و صفر
الحمير	١٢,٢ (٦,١)	٠,١ (٠,٠٣)	١٢,١ (٦,-)	صفر	١ : ١٢١ : صفر وصفر (1 : 121 : 0.0)

تابع جدول رقم (١)

نوع لحوم الحيوانات	ثنائــــى الببتيــــــدات				انسرين : كارنوسين : بالنين
	مجموع	انسرين	كارنوسين	بالنين	
الكانجارو	١٨,٢ (٤,٦)	١٥,٩ (٣,٨)	٢,٣ (١,٩)	صفر	١ : صفر و ١ : صفر وصفر (1 : 0.1 : 0.0)
الأرنب	٢,١	١٨,٩	٢,٢	صفر	١ : صفر و ١ : صفر وصفر (1 : 0.1 : 0.0)

المصدر : Carnegie et al, 1983



الفصل الثانى

الكشف عن لحم الخنزير

فى اللحوم المعاملة حراريا



الفصل الثانى

الكشف عن لحم الخنزير فى اللحوم المعاملة حراريا

الكشف عن لحم الخنزير فى اللحوم المعاملة حراريا (المطبوخة) فى اللحوم ومنتجاتها بواسطة الكت طريقة كورتكس الانجليزية

مقدمة :

تستعمل هذه الطريقة للتعرف على أنواع اللحوم المختلفة المطبوخة ومنها لحم الخنزير والتى تنص الشريعة الإسلامية على عدم أكله . وحيث تستخدم طريقة الأجسام المناعية المتخصصة المرتبطة بانزيم البيروكسيدين . وهى طريقة ناجحة وتتضمن تحليل البروتين الغذائى فى الغذاء . والأجسام المناعية تعتمد على خاصية مقاومة الحرارة . وعادة ما يؤخذ اللحم من العضلات المراد الكشف عن البروتين بها بعد معاملتها حراريا .

أساس الطريقة :

تعتمد الطريقة على الخاصية المناعية للانزيم حيث يتم ارتباط جزيئات بروتين اللحم بطريقة الساندوتش . ويستخدم بيوتين أفيدين لسرعة العملية .

تستخلص العينة مستخدمًا الماء أو المحلول الفسيولوجى البسيط . يوضع المستخلص المخفف فى الحفر البلاستيكية والتى تكون مغطاة بالأجسام المضادة الخاصة بكل نوع من لحوم الحيوانات . وكلما زاد تركيز البروتين . المراد الكشف عنه فى المستخلص كلما زادت الكمية الملتصقة منه بالأجسام المضادة

(*) المصدر (Cortecs Dignostics 1994) .

بالحفرة . بعد الغسيل وإزالة الزائد من البروتين (البروتين غير المرتبط) . يضاف بعد ذلك محلول بيوتينيلاتيد المرتبط بالأجسام المضادة لكل نوع من لحوم الحيوانات إلى الحفر المتخصصة بنوع اللحم ثم يضاف انزيم استربتافيدين بيروكسيديز المرتبط . تحضين الحفر ثم يتم غسيلها ثم يضاف محلول ايه بى تى اس (ABTS) فى كل حفرة ليبين نشاط انزيم البيروكسيديز بتكون لون أخضر وظهور اللون الأخضر يدل على وجود البروتين المراد الكشف عنه ويحدد البروتين كيفيًا إما بالرؤية العينية أو باستخدام جهاز اسبكتوفوتوميتر أو بجهاز قراءة الحفر .

تحضير واستخلاص عينات الاختبار :

محلول الاستخلاص :

يحضر المحلول الملحى (٩ مم ملح كلوريد صوديوم/ لتر ماء مقطر أو منزوع الأيونات) لاستخلاص عينات اللحوم . ويمكن استخدام الماء العادى عند الضرورة .

تحضير عينات الاختبار :

تستخدم اللحوم ومنتجاتها مفرومة ومطحونة وممزوجة جيدًا ومتجانسة لتعطى نتائج أفضل .

استخلاص عينات الاختبار :

- من حساسية التجربة يجب أن يلاحظ تجنب التلوث من عينه وأخرى وكذلك يستحسن غسل الأدوات جيدًا قبل استعمالها فى الاستخلاص (يفضل الغسيل للأدوات جيدًا بالماء والصابون ثم تجفف) .
- يوزن ٢٥ جرام من عينات اللحم السابق تجهيزه وتوضع فى أنبوبة نظيفة .

- يضاف ١٠٠ مـليلتـر من المحلول المـلحى (أو الماء عـند الضرورة) وتـغلق الأنبوبـة وترج جيدًا بـاليد أو علـى جهاز هز وإذا اسـتدعى الأمر يـسخن الخليط فى حمام مائى لمدة ١٥ دقيقة واتركها لمدة ١٠ - ١٥ دقيقة . أعد خلطا مرة أخرى جيدًا واتركها لمدة ١٠ - ١٥ دقيقة .
- يرشـح الخلـيط فـى وعاء نـظيـف وإذا استـدعى الأمـر تدور فـى جهـاز السنترفيوج حتى تحصل على سائل رائق .

فترة صلاحية محلول الاستخلاص :

يحفظ محلول عينـات الاستخلاص عند درجة حرارة ٢ - ٨° س لمدة ٣٦ ساعة ويمكن تخزينة لمدد طويلة بالتجميد عند درجة حرارة - ٢٠° س .

الكواشف :

- محلول كلوريد الصوديوم (٩ جمم/لتر) .
- مجموعة الكواشف مركبة من :

– المحلول الإيجابى : هو محلول فوسفات محايد وبه مادة حافظة تسمى ثيومرسال معبأة فى عدد من القوارير سعة كل منها ١,٥ مليلتر .

– قارورة بها ١,٥ مليلـتر محلول فوسفات الملحى محـايد ويحتوى على البيوتينيلاتيد المرتبط بالأجسام المضادة لكل نوع من لحوم الحيوانات .

– قارورة بها ٦ مليلـتر من محلول الفوسفات الملحـى والحامل للمصل وبه انزيم استربتافـيدين بيروكسيديز المرتبط ويحتـوى على مادة حافظة تسمى ثيومرسال .

– قارورة تحتوى على ١,٣٥ مليلتر من ايه بى تى اس (ABTS) .

- قارورة بها ١٢ مـليلتر من محلـول سترات البيروكسيـد المحايد والذى يتكون من محلول السترات المحايد مع بيروكسيد الهيدروجين .
- قارورة بها ١٠٠ مليلتر من محلول الغسيل المركز .
- قارورة تحتوى على ٦ مليلتر من محـلول إيقاف التفاعل والذى يحتوى على ١,٥ ٪ وزن/ حجم فلوريد الصوديوم فى الماء .

الأجهزة والأدوات :

وحدة قياس الحفر البلاستيكية وتختص كل منها بأجسام مضادة لكل صنف من لحوم الحـيوانات وتحتوى عـلى ١٢ شريط منـفرد كل شريط بـه ٨ حفر أى عدد كل الحفر ٩٦ حفرة والاثنى عشر شريطًا موضوعة فى إطار من البلاستيك ومعبأة فى كيس من الرقـائق البلاستيكية المبطنة لأعماق الحفـر مغطاة مسبقًا من الداخل بكـمية محدودة من الأجسام المـضادة لكل صنف معين مـن الحيوانات ويوجد داخل الكيس قرص ماص للرطوبة .

- خلاط ومفرمة لحم .
- ماكينة غسيل خاصة لغسل الحفر البلاستيكية .
- ماصات صغيرة سعة ٥٠ ، ١٠٠ ميكرولتر .
- جهاز لقراءة الحفر البلاستيكية ومـثبت به مرشح لمنع التداخل وطول موجة الجهاز هى ٤٠٥ أو ٤٢٠ نانومتر .
- وإذا استخدم جهاز سبكتروفوتومتر يكون طول الموجة الخاصة به هى ٤١٤ نانومتر .

تحضير مجموعة الكواشف :

- محلول البروتين الإيجابى لكل صنف من لحوم الحيوانات .
- محلول البيوتينيلاتيد المرتبط بالأجسام المضادة لكل نوع من لحوم الحيوانات .
- محلول أنزيم استربتافيدين بيروكسيديز المرتبط .
- محلول ايه بى تى اس (ABTS) ومحلول سترات البيروكسيد . تخلط محتويات كل زجاجة على حدة بقلبها إلى أسفل ثم إلى أعلى . لتجهيز محلول الشغل يخلط المحلولين بنسبة ١ : ٢٤ ويحضر المحلول طازجًا قبل العمل مباشرة . لكل ٢,٦ حفرة يضاف ٥, مليلتر من محلول ايه بى تى اس (ABTS) المركز إلى قارورة سترات البيروكسيد وتقلب بقلبها إلى أسفل ثم إلى أعلى .

محلول الغسيل المركز :

يجفف محلول الغسيل المركز بالماء المقطر أو منزوع الأيونات بنسبة ١/ ١٠ . لكل ٩٦ حفرة يوضع كل المحلول (١٠٠ مليلتر) فى قارورة حجمه وتكمل إلى لتر ماء . ولـ ٢٤ حفرة يوضع ٢٤ مليلتر من المحلول المركز إلى ٢١٦ مليلتر ماء مقطر أو منزوع الأيونات .

محلول إيقاف التفاعل :

قارورة تحتوى على ١,٥ ٪ فلوريد الصوديوم (وهو مادة سامة إذا لمس جزء من الجلد أو العين يغسل بسرعة جدًا الجزء الذى لامسه المحلول بالماء) تخلط القارورة جيدًا بالقلب إلى أسفل وأعلى .

وحدة قياس من الحفر البلاستيكية ، بها أجسام مضادة لكل صنف من

لحوم الحيوانات . عند بداية العمل بالتجربة يفتح الكيس بقصة من مكان القفل على طول الحافة المعرجة ثم يسحب الإطار المحتوى على الشرائط بحيث تكون فتحات الحفر إلى أعلى ، يسحب العدد المطلوب من الشرائط والمحتوى على الحفر المطلوبة وتثبت فى إطار آخر غير الموجود بالكيس وتترك باقى الأشرطة داخل إطارها الذى كانت فيه ، تعبأ مرة أخرى فى الكيس مع القرص الماص للرطوبة ثم يغلق بشريط لاصق .

فترة الصلاحية :

فترة صلاحية المواد والكواشف غير المفتوحة لمجموعة الكشف مدونة على البطاقة الخاصة بها مع الأخذ فى الاعتبار تخزين الكواشف التى فتحت للعمل بها لعدة أسابيع أو شهور على درجة حرارة ٢ - ٨° س .

طريقة العمل :

- تؤخذ الكواشف وكيس الشرائط من الثلاجة وتوضع فى درجة حرارة الغرفة العادية حتى تصل درجة حرارتها إلى درجة حرارة الغرفة قبل بداية الاختبار .
- تحضير مستخلصات اللحوم ومجموعة الكواشف .
- يوضع بماصة ميكرولترية ١٠٠ ميكرولتر من كل من المحلول الضابط الإيجابى (مستخلصات العينات المخففة) فى الحفر المناسبة لكل منها مع ملاحظة استخدام ماصة جديدة لكل نوع لمنع التلوث .
- توضع الشرائط وهى داخل إطارها على جهاز الهز لمدة ساعة لخلطها جيدًا أو أخلطها باليد بلطف . ثم غطها واتركها فى التحضين عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة .

- تغسل الحفر ٣ مرات بمحلول الغسيل باستخدام جهاز الغسيل ثم يجفف سطح الشرائط بورق تجفيف بالضغط على وسط الإطار لكى يُمْسك الإطار ثم إقلبه على ورق التجفيف لكى يزال نقط الغسيل من الحفر .
- يضاف ٥٠ ميكرولتر بماصة ميكرولترية من محلول بيوتينيلاتيد المرتبط بالأجسام المضادة لكل نوع من لحوم الحيوانات . مع تغيير الماصة كل مرة.
- توضع الشرائط وهى داخل إطارها على جهاز الهز لمدة ٦٠ دقيقة لخلطها جيدًا أو أخلطها باليد بلطف . ثم غطها واتركها فى التحضين عند درجة حرارة الغرفة .
- كرر عملية الغسيل ٣ مرات .
- يضاف ٥٠ ميكرولتر بماصة ميكرولترية محلول أنزيم استربتافيدين بيروكسيديز المرتبط فى كل حفرة .
- توضع الشرائط وهى داخل إطارها على جهاز الهز لمدة ٣٠ دقيقة لخلطها جيدًا أو اخلطها باليد بلطف . ثم غطها واتركها فى التحضين عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة .
- يضاف ١٠٠ ميكرولتر من محلول ايه بى تى اس (ABTS) إلى كل حفرة.
- توضع الشرائط وهى داخل إطهارها على جهاز الهز لمدة ٦٠ دقيقة لخلطها جيدًا أو اخلطها باليد بلطف . ثم غطها واتركها فى التحضين فى درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة .

(وإذا استخدم جهاز سبكتروفوتوميتر يكون الهز لمدة ٩٠ دقيقة والتحضين لمدة ٩٠ دقيقة) .

- يضاف ٥٠ ميترولتر بماصة ميكرولترية من محلول إيقاف التفاعل لكل حفرة.

- يخلط لمدة ١٠ ثوان على جهاز الهز أو يخلط باليد بلطف حتى ينتشر محلول إيقاف التفاعل فى المحلول كله ويمنع تكوين اللون .
- يجب أن تتم جميع القراءات خلال ٩٠ دقيقة من إضافة محلول إيقاف التفاعل .
- يتم الكشف على اللون بالعين المجردة بعد وضع الحفر على خلفية بيضاء ويرى اللون الأخضر .
- أو بجهاز قراءة الحفر البلاستيكية لقياس الامتصاص عند طول موجة ٤٠٥ أو ٤٢٠ نانومتر .
- أو بجهاز سبكتروفوتوميتر لقياس الامتصاص عند طول موجة ٤١٤ نانومتر.

التحليل الكمى :

وجد من المستحسن حساب القيمة المحددة كحد فاصل بين النتائج الإيجابية والسالبة وتسمى القيمة الحدية وهى أكثر دقة من التقييم بالعين المجردة .

ولحساب القيمة الحدية يؤخذ متوسط الامتصاص للعينات السالبة مضروبًا فى العامل ف (قيمة ف هى ٢,٥) .

وإذا كانت قيمة الاختبار للعينات أكبر من القيمة الحدية تعتبر النتيجة إيجابية .

ملحوظة : قيمة ف تختلف تبعًا لجودة الكواشف وطريقة استخلاص العينة من مختبر لآخر ومن صنف حيوان لآخر لذلك يستحسن حساب قيمة ف قبل إجراء التجربة وهى كالآتى :

ف = القيمة المئوية لامتصاص القيمة الموجبة / متوسط قيم امتصاص العينات السالبة

ومن قيمة ف الناتجة تحسب القيمة الحدية

القيمة الحدية = ف × متوسط الامتصاص للعينة السالبة

ملحوظة : ولتقدير قيمة ف الخاصة بكل نوع من اللحوم يحضر مستخلص عينة لحم أحمر تركيز $\frac{١}{١٠٠}$ أى يؤخذ من المحلول الملحى الرائق فوق عينة اللحم ١ ,٠ مليمتر ويضاف إليها ٩,٩ مليمتر من المحلول المخفف السابق ذكره ثم تؤخذ الكمية المناسبة وتخفف بالمحلول المجهز لكل صنف من الحيوانات كما سبق ذكره . عند اختبار هذا المحلول فإنه يعطى قيمة إمتصاص مساوية تقريبًا للقيمة الحدية عند استخدام ف = ٢,٥ وإذا حصلنا على إمتصاص مختلف عن القيمة الحدية من عينات اللحم عند استخدام ف = ٢,٥ فإنه يتعين إعادة الحساب لكل نوع لاستخراج قيمة ف المناسبة من المعادلة السابق ذكرها .

الكشف عن لحوم الخنزير فى اللحوم المعاملة حراريا
أو منتجات اللحوم المعلبة بطريقة اليسا
بروس(*) . دينز شركة ابحاث ايه بى سى جاينسفيل - فلوريدا

أساس الطريقة :

تعتـمد هذه الطريقـة على إجراء اختبـار مناعى بالارتبـاط الانزيمى ELISA بنوع معين من اللحم يحتوى على الأجسام المضادة Antibodies لهذا اللحم إلى مصل أو مـستخلص عـدة أنواع من اللحـوم المطبوخة والمـعلبة كل عـلى حدة يحتوى كـل منها على المواد المـولدة للأجسام المضـادة لكل نوع Antigen حيث يحدث نوع من الارتباط بين جزيئات هذا الكشاف وجزيئات النوع المقابل له من مصل اللحم أو مستخلص المنتج المناسب فقط لا يحدث إرتباط مع باقى الأنواع الأخرى من اللحوم ومنتجاتها وعليه عند إضافة كشاف اللون والذى يعطى لون أخضر فى حـالة جزيئات مرتبـطة فقط يمكن الـتعرف على نوع اللـحم الموجود بالعينة .

الأجهزة والأدوات :

١ - جهاز لقراءة الامتصاص المناعى من الشرائح .

٢ - جهاز غسيل خاص لغسيل الشرائح .

٣ - مضخة خوائية توضع على جهاز الغسيل .

٤ - مماصات إرجاع وملحقاتها .

٥ - شرائح ميكرواليسا .

(*) المصدر (Bruce, 1989) .

٦ - شرائح مغايرة Plate sealers .

٧ - المعدية Atonacher .

٨ - أكياس ويرل باك باج Whirl - pakbage .

٩ - جهاز طارد مركزى .

١٠ - ثلاجة (٤° س) .

١١ - رقائق معدنية .

١٢ - حجرة عالية الرطوبة (صندوق من البلاستيك محكم الهواء) .

١٣ - قوارير ارلنماير .

١٤ - ورق ترشيح ٤٥, ٠ يو ام (0.45 um) .

المواد الكيميائية والكواشف :

١ - ثنائى صوديوم فوسفات $Na_2 HPO_4$.

٢ - إحادى صوديوم فوسفات $NaH_2 PO_4$.

٣ - كلوريد الصوديوم .

٤ - حمض الستريك اللامائى .

٥ - ماء أكسجين ٣٠ ٪ .

٦ - توين ٨٠ Tween 80 .

٧ - كشاف إيه بى تى اس (ABTS) ٢ , ٢ أزينو - ثنائى - (٣ - إثيل بنز ثيازول) .

٨ - ثيمرسول (ميرثيولات) .

٩ - تزيد (هيدروكس مثيل) أمينوميثان (تى اتش ايه ام) أو حمض هيدروكلوريك التريزما والتريزماباز Trizmabase .

١٠ - حمض الهيدروكلوريك .

تحضير المحاليل :

١ - **محلول تريزماء** المحايد (الأس الهيدروجينى ٧,٧ عند درجة حرارة ٢٥° س) يحضر بإضافة ٥,٧٢ جرام هيدروكلوريك التريزما ، ١,٦٦ تريزماباز إلى لتر من الماء المقطر أو منزوع الأيونات ويذوب كاملاً هذا المخلوط يجب أن يكون الأس الهيدروجينى له ٧,٧ عند درجة حرارة ٢٥° س .

أو البديل هو :

محك تريز - حمض الهيدروكلوريك المحايد الأس الهيدروجينى ٨,٤ عند درجة حرارة ٢٥° س .

يحضر بإضافة ٦,٠٥٧ جرام تريز (هيدروكس مثيل) أمينوميثان (تى اتش ايه ام) ، أو جرام ثيمرسول (ميرثيولات) إلى لتر من الماء المقطر ويذوب كاملا تضبط درجة الأس الهيدروجينى عند ٨,٤ عند درجة حرارة ٢٥° س .

٢ - **محلول ملحى محايد من الفوسفات** ٠,١٥ إم عند أس هيدروجينى ٧,٢ (بى بى اس . PBS) .

يحضر بإضافة ١٠,٣٥ جرام من احادى صوديوم فوسفات ، ٤,٣٨ جرام من صوديوم كلوريد إلى لتر ماء مقطر ويذوب كاملا لتحضير محلول ثنائى القاعدة .

يضاف ١٠,٦٥ جرام ثنائى صوديوم فوسفات ، ٤,٣٨ جرام صوديوم كلوريد إلى لتر ماء مقطر يذوب كاملاً لتحضير محلول إحادى القاعدة .

يضاف كمية كافية من محلول ثنائى القاعدة إلى محلول إحادى القاعدة ويقلب جيدًا بمحراك مغناطيس ويقاس درجة الأس الهيدروجينى وتثبت عند ٧,٢ .

ملحوظة : خليط من ٤٠٠ مليلتر من إحادى القاعدة (إحادى صوديوم فوسفات) ، ١١٠٠ مليلتر من ثنائى القاعدة (ثنائى صوديوم فوسفات بى بى اس PBS) عند اس هيدروجينى ٧,٢ ثم بعد ذلك يوضع فى أوعية زجاجية ويوضع فى الأوتوكلاف لتعقيمه عند درجة حرارة ١٢١° س لمدة ١٥ دقيقة ويخز فى درجة حرارة الغرفة .

٣ - **محلول ملحى من الفوسفات** يحتوى على ٠,٠٥ ٪ توين - ٨٠ (بى بى اس تى PBST) .

إلى لتر من محلول ملحى محايد من الفوسفات ٠,١٥ إم عند درجة اس هيدروجينى ٧,٢ يضاف ٠,٥ مليلتر توين ٨٠ . واخلط (ليس على محراك مغناطيس) لعدة ساعات عند درجة حرارة الغرفة حتى يتم الذوبان . ثم يحفظ هذا المحلول فى الثلاجة عند درجة حرارة (٤° س)

٤ - **محلول ملحى من الفوسفات** يحتوى على ١٠ ٪ مصل أرنب طبيعى (بى بى اس تى PBTS وتحتوى على ١٠ ٪ مصل أرنب طبيعى NRS)يحضر هذا المحلول فى نفس يوم العمل . يضاف ٩ مليلتر من PBTS إلى ١ مليلتر من الراشح (٠,٤٥ , ٥٠ يوم إم) لمصل الأرنب غير النشط .

٥ - **محلو ملحى الضابط** :

يضاف ٨,٥ جرام صوديوم كلوريد إلى لتر ماء مقطر ثم يذوب كاملاً .

٦ - **المحلول الضابط السالب** :

يوضع ٢٠ جرام مكعبات صغيرة لحم أحمر طازج من لحم البقر فى كيس

ويرل باك باج به ٦٠ مليلتر من المحلول الملحى العادى ضع الكيس ومحتوياته فى المعدية والمعدة لمدة ١٠ ثوان ثم اتركها فى درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة . ضع محتويات الكيس فى قارورة إرلنماير سعة ١٢٥ مليلتر وغطها برقائق معدنية وضعها فى حمام مائى يغلى ثم إنقلها إلى أنابيب جهاز الطرد المركزى ودورها عند ١٠,٠٠٠ لفة لمدة ١٥ دقيقة . يرشح المحلول الطافى خلال ورق ترشيح (٠,٤٥ يو إم) ثم قسمها فى زجاجات سعة كل منها ٠,٥ مليلتر وخزنها عند درجة حرارة - ٢٠° س .

٧ - المحلول الضابط الإيجابى :

يحضر كما هو فى بند ٦ ولكن يستعمل لحم الخنزير الخام مكان لحم البقر .

٨ - محلول ايه بى تى اس - ماء أكسجين $ABTS - H_2 O_2$

يحضر محلول ٠,١ إم حمض الستريك من إذابة ١,٩٢ جرام من حمض الستريك اللامائى فى ١٠٠ مليلتر من الماء المقطر . يحضر محلول ٠,١ إم ثنائى صوديوم فوسفات من إذابة ١,٤٢ جرام من ثنائى صوديوم فوسفات فى ١٠٠ مليلتر ماء مقطر . ضع كميات كافية من المحلولين مع بعض واخلط جيدًا على محراك مغناطيس وقس درجة الأس الهيدروجينى بجهاز قياس الأس الهيدروجينى لتحضير ١٠٠ مليلتر من محلول ٠,١ إم سترات الفوسفات المحايد عند أس هيدروجينى ٤ إلى ١٠٠ مليلتر من المحلول الأعلى يحضر محلول ٠,١ إم سترات الفوسفات المحايد يضاف ٢٢ مليجرام من إيه بى تى اس ABTS (٢,٢ أزينو - ثنائى - (٣ - اثيل بتز ثيازولين حمض السلفونيك) ، ١٥ ميكرولتر من محلول ٣٠ ٪ ماء أكسجين . يخلط بلطف (بدون المحراك المغناطيسى) حتى يتم الذوبان . يرشح المحلول خلال ورق ترشيح (٠,٤٥ يوم إم) . ثم يوضع فى زجاجات معقمة وخزنه فى زجاجات

غامقة عند درجة حـرارة الغرفة حتى حين استعماله . هذا المحـلول يحضر قبل ٢٤ ساعة من احتياجة ويمكن استعماله مدة طويلة طالما لم يتغير لونه .

٩ - **محلول حمض الستريك ١ , ٠ إم**

يحضر كما هو موجود سابقًا .

تغطية شرائح ميكروايسا بالأجسام المضادة الصماء :

١ - يحضر ٥ قواريز ذات قاع مفلطح ، ٩٦ حفرة وشرائح وغطاء الشرائح من الصندوق الموجودة بها .

٢ - يحضر محلول مضادات الأجسام المغطاة بإضافة ٥٠٠ ميكرولتر (٥, ٠ ملـيلتر) من مضادات الأجسام المغطاة إلى ٥٠ مليلتر محلـول محايد من تريـز - حمض الهـيدروكلوريـك عند درجـة اس هيدروجيـنى ٨,٤ (أو محلول محايد من التريزما عـند اس هيدروجينى ٧,٧) لـتغطية ٥ شرائح يخلط جيدًا لمدة ساعة .

٣ - يستخدم ماصة ذات ٨ قنوات . يوضـع ١٠٠ ميكـرولتـر من محـلول الأجسام المضادة المغطاة فى حفر شرائح الميكروايسا .

٤ - تغطى الشرائـح ويوضع عليها علامة مميزة والتـاريخ ومضادات الأجسام . ثم توضع الشرائـح فى حجرة ذات رطوبة عالية وتخـزن عند درجة حرارة ٤° س لمدة ٢٤ سـاعة ويمكن أن تمتد فترة الصـلاحية حتى ٦ شهور إذا لم يجف محلول مضادات الأجسام المغطاة .

مجموعة الكواشف مركبة من :

١ - قارورة بها مـحلول أجسام مضـادة مغطاة ضد لحوم الخـنزير تغطى خـمسة شرائح .

٢ - قارورة بها محلول بيتينيلاتيد أجسام مضادة ضد لحوم الخنزير تكفى خمسة شرائح .

٣ - قارورة بها ٥ مليلتر من المحلول الضابط الإيجابى (لحوم خنزير Pork) .

٤ - قارورة بها ٥ مليلتر من المحلول الضابط السالب (لحوم بقر beef) .

٥ - مصل أرنب طبيعى غير نشط ١ مليلتر فى كل قارورة سعتها ١٢ مليلتر مخفف ١ : ١٠ (عدد القوارير خمسة) .

٦ - قارورة بها ٥, مليلتر من محلول أنزيم إستربتافيدين هورس راديش بيروكسيدير (streplavidin - horseradish peroxidare)

٧ - خمسة شرائح ميكرواليسا ، ٩٦ حفرة ، قوارير ذات قاع مفلطح .

٨ - خمسة أغطية لشرائح الخلات Acetate plate seals .

٩ - قارورة بها محلول ايه بى تى اس ABTS اليسا لكل نوع من لحوم الحيوانات .

١٠ - صندوق لمجموعة الكواشف (يستخدم حجرة ذات رطوبة عالية لتخزين مضادات الأجسام المغطاة) .

تخزين مجموعة الكواشف :

١ - محلول انزيم استربتافيدين هورس راديش بيروكسيديز (SHRP) يخزن عند درجة حرارة ٥° س .

٢ - جميع الكواشف الأخرى تخزن عند درجة حرارة - ٢٠° س .

٣ - شرائح ميكرواليسا تترك فى درجة حرارة الحجرة حتى تغطى .

٤ - الشرائح المغطاة تخزن عند درجة حرارة ٥° س .

٥ - باقى الكواشف التى لم تستخدم تخزن عند - ٢٠° س بعد الاستعمال .

إستخلاص العينة :

تجهز مستخلصات العينة من اللحوم المطبوخة أو المعلبة كما يأتى :

١ - ضع ٥ جرام من مكعبات اللحم فى كيس ويرل باك باج المحتوى على ١٠ مليلتر ماء مقطر .

٢ - ضع الكيس فى المعدية والمعدة لمدة ٦٠ ثانية .

٣ - ينقل الكيس من المعدية وتترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة .

٤ - صب بعض من محتويات الكيس فى أنابيب جهاز الطرد المركزى ودور عند ١٥٦٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة ١٠ دقائق .

٥ - السائل الرائق الطافى لمستخلص اللحم يستخدم فى اليسا (ELISA) .

طرق عمل اليسا :

١ - تنقل شريحة الأجسام المضادة الصناعية لكل نوع من اللحوم المرغوب الكشف عنها من الحجرة ذات الرطوبة العالية ويرفع من عليها الغطاء .

٢ - توضع الشريحة على حامل جهاز الغسيل وتغسل ثلاث مرات محلو ملحى محايد الفوسفات ويحتوى على توين ٨٠ .

٣ - تقلب الشريحة على فوطة ورقية ناعمة لإزالة بقايا المحلول الملحى للفوسفات .

٤ - يوضع ١٠٠ ميكرولتر من المحلول الضابط السالب لمستخلص لحوم البقر فى الحفر ١٢ إيه خلال ١٢ دى .

٥ - يوضع ١٠٠ ميكرولتر من المحلول الضابط الإيجابى لمستخلص لحوم الخنزير فى الحفر ١٢ إى خلال ١٢ إتش .

٦ - يوضع ١٠٠ ميكرولتر من المحلول الملحى العادى فى الحفر ١ إيه خلال ١ إتش .

٧ - لكل عينة ٤ حفر وسعة كل حفر ١٠٠ ميكرولتر .

٨ - تغطى الشريحة وتترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة .

٩ - تكرر الخطوة رقم ٢ ، ٣ .

١٠ - يخفف محلول بيوتينيلاتيد الأجسام المضادة . بإضافة ١٥ ميكرولتر من بيوتينيلاتيد الأجسام المضادة إلى ٣ مليلتر من مصل الأرنب العادى المحضر بنسبة ١٠ ٪ فى محلول الملحى المحايد من الفوسفات والمحتوى على توين ٨٠ لكل شريحة .

١١ - يوضع ٢٥ ميكرولتر من المحلول المحايد من الفوسفات المحتوى على توين ٨٠ والمحتوى على ١٠ ٪ من مصل الأرنب العادى داخل قاع الحفر ١ إيه خلال ١ إتش .

١٢ - يوضع ٢٥ ميكرولتر من المحلول المخفف من بيوتينيلاتيد الأجسام المضادة Biotiny lated Antibodies فى قاع جميع الحفر ما عدا حفر ١ إيه خلال ١ إتش . لاحظ قاع الحفر يجب أن يكون مغطى بالسائل .

١٣ - تغطى الشريحة وتترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة .

١٤ - تكرر الخطوة رقم ٢ ، ٣ .

١٥ - يخفف محلول انزيم استربتاسيدين هورس راديش بيروكسيديز Streptovidin - horseradish peroxidose المرتبط (SHRP) بـ ١ : ٤١ +

٤,٩ مليلتر من المخفف ليكون التخفيف الكلى ١ : ٢٠٥٠ المخفف يحضر طازجًا من المحلول الملحى المحايد من الفوسفات المحتوى على توين ٨٠ والمحتوى على ١٠ ٪ من مصل الأرنب العادى غير النشط .

١٦ - يوضع ٢٥ ميكرولتر من المخفف المرتبط فى قاع جميع الحفر ولاحظ قاع الحفر يجب أن يكون مغطى بالسائل .

١٧ - تغطى الشريحة وتترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة .

١٨ - تكرر خطوة رقم ٢ مع الغسيل ٤ مرات وبعد أن تملأ الحفر فى رابع مرة إضغط على زر جهاز الغسيل ليترك محلول الغسيل المحايد فى الحفر .

١٩ - تغطى الشريحة وتترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة .

٢٠ - توضع الشريحة على جهاز الغسيل ويتم شفط محلول الغسيل المحايد الموجود بالحفر .

٢١ - تكرر الخطوة رقم ٣ .

٢٢ - يوضع ٥٠ ميكرولتر من محلول إيه بى تى اس - ماء الأكسجين ABTS - H_2O كمحلول كاشف فى قاع الحفر .

٢٣ - تغطى الشريحة وتترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة .

٢٤ - يوضع ٥٠ ميكرولتر من محلول الإيقاف (حمض الستريك ١,٠ إم) فى جميع الحفر .

٢٥ - توضع الشريحة فى جهاز قراءة الشرائح عند طول موجة ٤٩٢ .

تحليل المعطيات :

١ - تحديد القيم المتوسطة للحفر الإيجابية الضابطة (١٢ إى خلال ١٢ إتش) ومعامل الإنحراف .

٢ - تحديد القيم المتوسطة للحفر السالبة الضابطة (١٢ إيه خلال ١٢ دى) ومعامل الإنحراف .

٣ - إذا كان متوسط قراءة الحفر الإيجابية الضابطة أكبر من ٠,٦٠٠ ، ومعامل الإنحراف لا يزيد عن ٠,٠٦٠ وإذا كان متوسط قراءة الحفر السالبة الضابطة أقل من ٠,٠٦٠ حينئذ يكون الاختبار صحيح خلاف ذلك يكون الاختبار غير صحيح .

٤ - تحديد القيم المتوسطة لكل عينة ومعامل الانحراف الخاص بها . أى عينة لها قيمة متوسط إمتصاص ومعامل إنحراف - ٣ ويكون متوسط الإمتصاص أكبر من ٠,٢٥ تعتبر العينة إيجابية وباقى العينات الأخرى سالبة .

هذه الطريقة تكشف عن لحم الخنزير فى اللحوم المطبوخة والمعلبة حتى ١ ٪ .

٢ - إذا كان متوسط قيم الامتصال فى الضوابط عالى قليلا أو أقل قليلا من القيمة القصوى يجب ضبط محلول بيوتنيلاتيد الأجسام المضادة كما يلى :

أ - فى مجموعة الكواشف الجارى العمل بها يكون ١٥ ميكرولتر من محلول بيوتينيلاتيد الأجسام المضادة/ ٣ مليلتر من المحلول المحايد من الفوسفات المحتوى على توين ٨٠ والمحتوى على ١٠ ٪ مصل الأرنب العادى غير النشط .

ب - إذا كان الضابط (Control) عالى يكون ١٢ ميكرولتر من محلول بيوتينيلاتيد الأجسام المضادة/ ٣ مليلتر من المحلول الملحى المحايد من الفوسفات المحتوى على توين ٨٠ والمحتوى على ١٠ ٪ مصل الأرانب العادى غير النشط .

جـ - إذا كـان الضـابط (Control) أقـل يكون ١٨ مـيكرولتر من مـحلول تينيلاتـيد الأجسام المضادة/ ٣ مليـلتر من المحلول الملحـى المحايد من الفـوسفات المحـتوى علـى تويـن ٨٠ والمحتوى عـلى ١٠ ٪ مصل الأرانب العادى غير النشط .

الكشف على أنواع لحوم الحيوانات المعاملة حراريا واللحوم المعلبة ومنتجات لحوم الدواجن بطريقة الارتباط الانزيمى

روثالدجى . برجر . قسم الميكروبيولوجيا والمناعة
فى إم إم بى . إم دى ١٩٨٧(*)

أساس الطريقة :

تعتمد هذه الطريقة على الاستخلاص البسيط للعينات بالماء بجانب عمل اختبار إمتصاص مناعى بالارتباط الانزيمى ELISA فى صورة مضخة من الأجسام المضادة المزدوجة بطريقة الساندوتش يضاف مستخلص اللحوم أو منتجاتها كل على حدة (يحتوى كل منها على المواد المولدة للأجسام المضادة لكل نوع Antigens حيث يحدث نوع من الارتباط بين جزيئات الكشاف الخاص بنوع معين من اللحم (يحتوى على الأجسام المضادة Antibodies لهذا اللحم ولا يحدث ارتباط مع باقى الأنواع الأخرى من اللحوم ومنتجاتها وعليه عند إضافة كشاف اللون الذى يعطى لون أخضر نتيجة تفاعل الانزيم مع الكاشف فى حالة وجود جزيئات مرتبطة فقط .

ملحوظة : إذا تعرضت المواد المولدة للأجسام المضادة Antigen لدرجة حرارة عالية أو مرتفعة فى اللحوم ومنتجاتها المعلبة ومنتجات لحوم الدواجن فإن الـ Antigen يفقد طبيعته الخاصة ولا يمكن قياس الامتصاص المناعى .

الأجهزة والأدوات :

١ - جهاز لقراءة الامتصاص المناعى من الشرائح .

(*) Ronald et al, 1987 .

٢ - جهاز غسيل خاص للشرائح .

٣ - مضخة خوائية توضع على جهاز الغسيل .

٤ - ماصات مختلفة الأحجام وعديدة القنوات .

٥ - ماصات إبندروف مختلفة الأحجام .

٦ - قوارير مختلفة الأحجام .

٧ - المعدية Stomacher .

٨ - أكياس مختلفة الأحجام ويرل باك باج (Wirl - pak bags) .

٩ - جهاز طارد مركزى .

١٠ - ثلاجة .

١١ - مجمد .

١٢ - رقائق معدنية .

١٣ - قوارير إرلنمير .

١٤ - حجرة عالية الرطوبة (صندوق من البلاستيك محكم الهواء) .

١٥ - ورق ترشيح مختلف الأحجام .

١٦ - شرائح مغايرة plate sealers .

المواد الكيميائية والكواشف :

١ - ثنائى صوديوم فوسفات $Na2H\ PO_4$.

٢ - إحادى صوديوم فوسفات $Na2H\ PO_4$.

٣ - كلوريد الصوديوم .

٤ - حمض الستريك اللامائى .

٥ - ماء أكسجين ٣٠ ٪ .

٦ - توين ٨٠ Tween 80.

٧ - كشاف إيه بى تى إس (ABTS) (٢,٢ أزينو - ثنائى - (٣ - اثيل بنز ثيازول حمض السلفونيك (2.2 azino - di - C3 - ethyl Benzthinazole suefonis acid) .

٨ - ثيمرسول (ميرثيولات) .

٩ - تريزما باز Trizma base .

١٠ - حمض هيدروكلوريك التريزما Trizma HCL .

١١ - حمض الهيدروكلوريك .

١٢ - الأجسام المضادة المغطاة (تحفظ عند درجة حرارة - ٢٠° س أو أقل) .

١٣ - محلول بيوتينيلاتيد للأجسام المضادة (تحفظ عند درجة حرارة - ٢٠° س) .

١٤ - محلول انزيم استربتافيدين هورسيديش بيروكسيديز - streptavidin Horseadish peroxidase المرتبط (يحفظ عند درجة حرارة ٤° س) .

١٥ - مصل الأرانب الطبيعى (العادى) (يسخن عند درجة حرارة ٥٦° س ليقل نشاطه لمدة ساعة ثم يرشح ويعقم ويخزن عند درجة حرارة - ٢° س) .

تحضير المحاليل :

١ - **المحلول المحايد الذى** يستخدم كغطاء Coating buffers (٠٥ , إم تريـز حمض الهيدروكلوريك رو الاس الهيدروجينى ٧,٧) .

يحضر بوزن ٥,٧٢ جم من تريزمـا حمض الهيدروكلوريك ، ١,٦٦ جرام تـريزما باز ، ١٠ , جرام ثيمرسول (مـيرثيولات) يضاف المـاء المقطر حتى لتر يقبل جيدًا حتى تذوب المواد الكيميائية السابق ذكرها .

٢ - **محلول الغسـيل المحـايد** (٠٧٥ , إم فـوسفـات ، ٠٧٥ , إم كـلوريـد صوديوم، ٠٥ , ٪ توين ٨٠ ، الاس الهيدروجـينى ٧,٢) يحـضر بوزن ١٥,٧٨ جرام ثنائى صوديوم فوسفات ، ٨,٧٦ كلوريد الصوديوم ويذوب فى ماء مقطر ثم يـضاف ١ مليلتر توين ٨٠ ثم يقلب حتـى يكتمل الذوبان ويكمل بالماء المقطر حتى ٢ لتر .

٣ - **محلول التخفيف** (يحتـوى على ١٠ ٪ من مصل الأرانب الـساخن غير النشط) .

يحضر هذا المحـلول فى نفس يوم العمـل بإضافة ٢ مليلتـر من مصل الأرانب العـادى الساخن غـير النشـط إلى ٩ مليـلتر من مـحلول الغـسيل المحايد .

٤ - **المحلول الملحى العادى** :

يحضر بوزن ٨,٥ جرام كلوريد صوديوم ويذاب فى لتر ماء مقطر .

٥ - **محلول ايه بى تى اس** - ماء أكسجين (الاسم الهيدروجينى ٣,٩) ABTS - H_2O_2

يـحضـر المحلـول بوزن ٠,٩٠٤ جرام مـن حمـض الـستريـك اللامـائى

٠,٧٥٠ جرام ثنائى صوديوم فوسفات ، ٢٢ مليجرام ايه بى تى اس (ABTS) (٢,٢ أزينو - دى - (٣ - اثيل بـنزثيازولين حمض السلفـونيك) تذاب فى مـاء مقطر ثم يضاف ١٥ ميكرولتر من ٣٠ ٪ ماء أكسجين ويكمل المحلول بالماء المقطر حتى ١٠٠ مليلتر ثم يتم الترشيح والتعقيم ويحفظ فى زجاجات غامقة.

٦ - **محلول إيقاف التفاعل** (١,٠ إم حمض سـتريك) يحـضر بوزن ١,٩٢ جرام حمض سـتريك اللامائى ويذاب فـى الماء المقطر ويكـمل حتى ١٠٠ مليلتر بالماء المقطر .

٧ - **الضوابط :**

يوزن ٢٠ جرام من اللحم الطازج وتقطع إلـى مكعبات صغيرة وتوضع فى أكياس الويرل بـاك باج ويضاف إليها ٦٠ مليتر من المحلـول الملحى العادى ثم يوضع الكيـس ومحتوياته فى المعـدية والمعدة (Stomacher) لمدة ١٠ ثـوان ثم يترك لمدة ساعة فـى درجة حرارة الحجرة . توضع محتويـات الكيس فى قارورة إرلنمـاير سعة ١٢٥ مليلتر ثـم تغطى بالرقائـق المعدنية وتوضع فى حـمام مائى يغـلى لمدة ١٥ دقيقـة . ثم تنقـل محتويـات القارورة إلى أنـابيب جهـاز الطرد المركزى ويدور عـند ١٠,٠٠٠ لفة فـى الدقيقـة لمدة ١٥ دقيـقة ثم بعـد ذلك يرشح المحلول وبعد ذلك يخزن الراشح عند درجة حرارة - ٢٠° س يكرر هذا الإجراء لكل صنف من اللحوم على حدة .

استخلاص العينة :

تحضر عينات الاستخلاص من اللحوم المطبوخة ومنتجات اللحوم المعلبة كما يأتى :

١ - يوضع ٥ جرام مـن مكعبات اللـحوم مع ١٠ مليلـتر ماء مقطر فـى كيس ويرل باك باج .

٢ - يوضع الكيس ومحتوياته داخل المعدية والمعدة لمدة ٦٠ ثانية .

٣ - يخرج الكيس من المعدية والمعدة ويترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة.

٤ - يوضع المحلول الموجود بداخل الكيس فى أنابيب جهاز الطرد المركزى ويدور عند ١٥٦٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة عشر دقائق .

٥ - المحلول الطافى الرائق لمستخلص اللحوم يستخدم فى اختبار وفحص الامتصاص المناعى بالارتباط الانزيمى ELISA .

تغطية شرائح ميكرو اليسا بالأجسام المضادة الصماء :

١ - يحضر ٥ قوارير ذات قاع مفلطح ، ٩٦ حفرة ، شرائح .

٢ - يحضر محلول الأجسام المضادة لكل نوع من اللحوم المستخدمة فى التجربة بإضافة ١٠٠ ميكرولتر من محلول الأجسام المضادة لكل صنف من لحوم الحيوانات إلى ٥٠ مليلتر من المحلول المحايد لتغطيتها ثم توضع على جهاز الهز لمدة ساعة لخلطها جيدًا .

٣ - يوضع ١٠٠ ميكرولتر من محلول الأجسام المضادة المغطاة إلى داخل الحفر الموجودة فى شرائح ميكرواليسا .

٤ - تقفل كل الشرائح ويعطى كل نوع من اللحم علامة مميزة ويكتب تاريخ القفل . وتوضع الشرائح فى حجرة ذات رطوبة عالية وتخزن عند درجة حرارة ٤ س لمدة ٢٤ ساعة ويمكن أن تمتد فترة الصلاحية إلى ٦ شهور إذا لم تفتح الشرائح .

طريقة عمل اليسا (ELISA)

١ - تنقـل شريحة الأجسـام المضادة الصنـاعية لكـل نوع من اللحـوم المرغوب الكشف عنها من الحجرة ذات الرطوبة العالية ويزال من عليها الغطاء .

٢ - توضع الـشريحة علـى حامل جهاز الـغسيل وتـغسل ثلاث مرات بمـحلول الغسيل المحايد .

٣ - تقـلب الشريـحة على فـوطة ورقية نـاعمة لإزالة بـقايا محـلول الغسـيل المحايد.

٤ - يوضع ١٠٠ ميكرولتر من المحلول الملحى العادى داخل الحفر ١ إيه خلال ١ إتش .

٥ - يوضع ١٠٠ ميكرولتر من المحلول الإيجابى المحايد لمستخلص اللحوم لكل صنف من الحيوانات فى الحفر ١٢ إى خلال ١٢ إتش .

٦ - يوضع ١٠٠ ميكرولتر من المحلول السالب المحايد لمستخلص اللحوم داخل الحفر ١٢ إيه خلال ١٢ دى .

٧ - الحفر الباقية تسـتعمل للعينات كل عينة لهـا ٤ حفر حجم كل حفرة ١٠٠ ميكرولتر .

٨ - تغطى الشريحة وتترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة واحدة .

٩ - تكرر الخطوة رقم ٢ ، ٣ .

١٠ - يخـفف محلـول بيوتيـنيلاتيـد الأجسام المضـادة بمصل الأرانب الـعادى الساخن غير النشط .

١١ - يوضع ٢٥ ميكرولتر من المحلول المخفف فى بند ١٠ فى قاع الحفر ١ إيه خلال ١ إتش .

١٢ - يوضع ٢٥ ميكرولتر من المحلول المخفف فى بند ١٠ فى كل الحفر ما عدد ١ إيه خلال ١ إتش . لاحظ قاع كل حفرة لابد أن يغطى بالسائل ولاحظ عدم وجود أجسام مضادة على جرار الحفر .

١٣ - تغطى الشريحة وتترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة .

١٤ - تكرر الخطوة رقم ٢ ، ٣ .

١٥ - يخفف محلول انزيم استربتاليدين هورش راديش بيروكسيديز streptavidine - horse radish peroxidese المرتبط بـ ١ : ٤١ من المحلول المخفف (مثلا ٢٥ ميكرلتر + ١ مليلتر من المخفف) ثم يعمل ١ : ٥٠ تخفيف (مثلا ١٠٠ ميكرولتر من ١ : ٤١ + ٤,٩ مليلتر من (المخفف) ليكون التخفيف الكلى ١ : ٢٠٥٠ .

١٦ - يوضع ٢٥ ميكرولتر من المخفف المرتبط فى قاع الحفر ولاحظ كل حفرة تكون مغطاة بالسائل مع عدم وجود السائل المرتبط على جدار الحفر .

١٧ - تغطى الشريحة وتترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة .

١٨ - تكرر خطوة رقم ٢ مع الغسيل ٤ مرات وبعد أن تملأ الحفر فى رابع مرة إضغط على زر جهاز الغسيل ليترك محلول الغسيل المحايد فى الحفر .

١٩ - تغطى الشريحة وتترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة .

٢٠ - توضع الشريحة على جهاز الغسيل ويشفط محلول الغسيل المحايد الموجود بالحفر .

٢١ - تكرر الخطوة رقم ٣ .

٢٢ - يوضع ٥٠ ميكرولتر من المحلول الكاشف ايه بى تى اس - ماء الأكسجين ABTS - $H_2 O_2$ داخل قاع الحفر .

٢٣ - تغطى الشريحة : وتترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة .

٢٤ - يضاف ٥٠ ميكرولتر من محلول الإيقاف (٥, ٠ إم حمض ستريك فى كل الحفر) .

٢٥ - توضع الشريحة فى جهاز قراءة عند طول موجة ٤٩٢ نانو متر .

تحليل المعطيات :

١ - تحديد القيم المتوسطة للحفر الإيجابية الضابطة (١٢ إى خلال ١٢ إتش) ومعامل الانحراف .

٢ - تحديد القيم المتوسطة للحفر السالبة الضابطة (١٢ إيه خلال ١٢ دى) .

٣ - إذا كان متوسط قراءة الحفر الإيجابية الضابطة أكبر من ٦٠, ٠ ، ومعامل الانحراف لا يزيد عن ٠٦, ٠ وإذا كان متوسط قراءة الحفر السالبة الضابطة أقل من ٠٦, ٠ حينئذ يكون الاختبار صحيح .

٤ - تحدد القيم المتوسطة لكل عينة ومعامل الانحراف الخاص بها . أى عينة لها قيمة متوسط إمتصاص ومعامل إنحراف - ٣ ويكون متوسط الإمتصاص أكبر من ٢٥, ٠ تعتبر العينة إيجابية وباقى العينات الأخرى تكون سالبة .

تمييز أصناف اللحوم المعاملة حراريا بواسطة البصمة الانزيمية على الجيل ذو التركيز المتعادل كهربائيا

ب.ال كنج

س. اس. اى . آر . قسم ابحاث الاغذية

معمل ابحاث اللحوم باستراليا ١٩٨٣(*)

اساس الطريقة :

يمكن استعادة درجة نشاط أنزيم أدينيلات كيناز وأنزيم كرياتين كيناز على الأقل جزئيا وذلك باستخلاص منتجات اللحوم المطبوخة بواسطة ٦ مول جوانيدين هيدروكلوريد ثم إجراء الفصل بالانتشار الفشائى للمستخلص فى ١ ٪ تريتون (نواة التريتوم) - اكس ١٠٠ ، بشرط ألا يجرى تسخين اللحم لدرجة حرارة أعلى من ١٢٠° (بالنسبة للأدينيلات كيناز) أو ١٠٥° س (بالنسبة للكرياتين كيناز) ويمكن التعرف على عدد كبير من الأصناف الحيوانية من اللحوم المطبوخة بتمييز بصمة هذين الأنزيمين على الجيل ذو التركيز المتعادل كهربائيا ، إلا أنه إذا كانت العينة مكونة من مخاليط من دهن لحوم أصناف مختلفة ، فإن مشابهات الكرباتين (ذات الصيغة الجزئية المزدوجة) - التى تتولد وتظهر أثناء الانتشار الفشائى علاوة على الأشرطة الإضافية تجعل تفسير تكوين هذه الأنظمة على الجيل أمرًا معقدًا .

الكواشف :

محلول الجوانيدين هيدروكلوريد

ثلاثى هيدروكسيد ميثيل أمينوميثان

(*) المصدر (King, 1983) .

ثنائى ثيوسريتول

تريتون (نواة الترتيوم)

ميركابتو إيثانول

أمفولايتس

فارماسيا (فارملايت)

أنزيم فوسفو جلوكونات دى هيدروجيناز ، الفوسفور جلوكوميتاز .

أجاروز (ال، ك، بى أيزوجيل أجاروز - آى اف)

بولى سترين (اف ام س جيل يوند)

آجار

أدينوزين - ٥ - ثنائى الفوسفات

جلوكوز

بيتا - نيكوتيناميد

أدينين ثنائى نيوكليوتيد فوسفات

كبريتات المغنسيوم

ثلاثى هيدروكس أمينوميثان

هكسوكيناز جلوكوز

فوسفات دى هيدروجيناز (بوهرينجر ١٢٧٨٢٥)

نيتروبليوتينزا زوليم

فينازين ميثوسلفات

فورمازون

حمض الخليك

ميثانول

كرياتين فوسفات

أنزيمات تريوز فوسفات أيزوميريــز ، إن ايه اتش دينوريز ، مانوز فوسفات أيزوميريز ، أدينودى أمينيز وفوسفور جليكريت كيناز .

الأجهزة والأدوات :

- جيل الاجروز .
- حضانة .
- أتوكلاف .
- فرن مزود بمروحة ذات حركة دوارة للهواء .
- بولى ستيرين .
- جهاز قياس الكثافة البصرية (ترانسيدين ٢٩٥٥) .
- جهاز كومبيوتر (تيكنزونيكس ٤٠٥٢) .
- أكياس بولى إيثيلين .
- قوارير زجاجية .

عينات اللحم :

تم الحصول على عينات لحم العضلات المستخدمة كمادة خام مرجعية أصلية من الحيوانــات البالغة المذبوحــة فى معمل أبحاث الــلحوم باستراليــا (الماشية - الغنم - الماعــز - القطط - الكلاب - الأرانب) أما (الخيــل والكلاب) فمن كانكــرى ، أما الحيوانات الــتى قتلت بإفــتراسها فهــى (البوسوم ، الكــنجارو الرمادى ، الكــنجارو الأحمر ، الخنــزير ، الجمل ، الجاموس ، الأمــو (طائر

كالنعامة ولكن صغير) . العينات الأخرى من اللحم (سواء الخام منها أو المطبوخ) فقد تم شراؤها من منافذ البيع بالتجزئة ، والعينات التى أقل من ١٠ مم جرى طبخها لمدة ثلاثون دقيقة فى المعمل إما عن طريقة :

١ - وضعها فى أكياس بولى ايثلين مغمورة فى الماء (عند درجة حرارة تصل إلى ١٠٠ س) .

٢ - وضعها فى قوارير زجاجية فى الأوتكلاف (عند درجة حرارة تتراوح ما بين ١٠٥° إلى ١٢٠° س) .

تجهيز العينات :

جميع العينات سواء كانت من عضلات اللحم أو من اللحم المطبوخ يتم طحنها إلى بودرة دقيقة بعد تجفيفها (تجميد يليه تجفيف) ثم تخزينها عند - ٢٠° س قبل الاستخلاص ، وطحن العينة يجعلها متجانسة ويسهل بالتالى عملية الاستخلاص .

يؤخذ حوالى (٢٠ ± ٠١ , مجم) من المسحوق الجاف ويستخلص بـ ٥ مل من محلول يحتوى على الجواندين هيدروكلوريد تركيزه يتراوح ما بين صفر إلى ٦ مول ، بالإضافة إلى ٢٠ مليمول ثلاثى هيدروكس ميثيل أمينوميثان ، و٢١ مليمول ثنائى ثيوسريتول عند رقم اس هيدروجينى = ٨ ، ويجرى التقليب لمدة ساعة عند درجة حرارة الغرفة (٢٠ - ٢٣° س) . بعد الطرد المركزى عند ٠٠٠ , ٥٠ لفة لمدة نصف ساعة عند ١٥° س ، الجزء العلوى الطافى يفصل بالانتشار الفشائى بوضعه فى محلولين (حجم كل منهما ٢ لتر) إحداهما ١ ٪ تريتون (نواة الترتيوم) اكس - ١٠٠ ، والآخر ١ , ٠ ٪ - ٢ مير كابتو إيثانول وذلك لمدة ١٨ ساعة .

التركيز البؤرى للجهد الكهربائى المتعادل :

تم الحصـــول على الحامـــل أمفولايتس ال ، ك ، بنى برودكتـــور ايه بى (الامفولين رقم الاس الهيدروجينى لـه من ٥ إلى ٨) والفارماسيا (فارملايت رقم الاس الهـيدروجيـنى من ٥ إلـى ٨ ، إلى ١٠,٥) ، والجـيل (٢٤٠ × ١١٤ × ٠,٥ مم) يحتوى على ١ ٪ أجاروز (ال ، ك ، بى أيزوجيل أجاروز - اى اف) ١ ٪ تريتون اكس - ١٠٠ و ٣,٣ ٪ كارير أمفولايتس ثم تحضيره من الاجاروز المغطى بغشاء من البولى سترين (اف ام سى جيل بوند) .

يثبـت الجيل فوق قـالب مراعاة حـركة الماء البـارد ، وأيضا يراعـى تفادى حدوث التكثيف فوق السطح ، يوضع أو يثبت الجيل عند درجة حرارة الغرفة، يوضع ٢ ميكرولتر ، كل عينة تبعد حوالى ٤٢ مم من القطب الموجب (الأنود) و ٧٢ مم من القطب السالب (الكـاثود) ، يمرر الماء عند درجة حرارة ١٠° س ليدور خـلال القالب الـبارد عند بـدء تشغيـل القوة ، فى الحـال يشغل مـفتاح التـشغيل أولا عـند أدوات لمدة نصـف ساعة ثم بـعد ذلك إلى ١٠ وات بـاقى الساعة يستعمل قطب سطحى لقيـاس الاس الهيدروجينى خلال المسافة الفاصلة بين الأنود والكاثود .

طرق إجراء البصمة :

يجرى عمل البـصمة الخاصة بدرجة نشاط الانزيم أساسًا عـلى الجيل طبقًا لطريقة هاريز هوبكينسون (١٩٧٦) التفاصيل الخاصة بطرق إجراء تغطية الأجار بالنسبة لأنزيمى الادينيلايت كيناز ، والـكرياتين كيناز موضحه أسفل هذا الكلام ويعتمد تمييز الأصناف كما هو موضح هنا على هذين الانزيمين بصفة أساسية .

١ - ادينيلايت كيناز :

يضاف إلى ٢٠ مل لمحلول المادة التى يعمل عليها الانزيم (المحتوية على ٥ مـليمول أدينوزين - ٥ - ثنائـى الفوسفات و ١ , ٠ مول جلوكوز ، و ٢ , ٠ مليمـول بيتا - نيكوتـيناميد - أدينين ثـنائى نيوكلـيوتيد فوسفات ، ٢ مـليمول كبريتات المغنيسيوم و ٢ , ٠ مول ثلاثى - هيدروكس أمينوميثان مضبوط عند رقم اس هـيدروجينى ٧,٨) يـضاف إليها ٥٠ ميكـروليتر هكسوكيـناز جلوكوز - ٦ فـوسفات دى هيدروجيناز (بوهرينجر ١٢٧٨٢٥) و ١ مل نيتروبليوتيترا زوليم (١ ٪ فى الماء ، افينازين ميثوسلفات (٢ , ٠ ٪ فى الماء) و ٤٠ مل أجار (٢ ٪ فى الماء تذاب بالغليان ثم تبرد إلى ٦٠° س) هذا المحلول المذكور يصب كغطاء على جيل الاجاروز بعد إجـراء التركيز البؤرى للجهد الكهربـائى المتعادل يوضع الجيل بعد ذلك فى الظلام فى حضانة عند ٤٥° س وفى خلال ١٥ دقيقة تظهر الشرائط عند الوصول بشدة أو قوة البصمة إلى الدرجة المطلوبة ، يوقف تفاعل الفـورمازون فى الظـلام يغمر الجـيل فى مـحلول مائـى يحتوى عـلى ١,٥ ٪ حمـض خلـيك و ١ ٪ ميـثانول . هذا المحـلول يتغـير عدة مرات خـلال مدة يومين. بعد ذلك يجفف الجيل على غشاء البولى ستيرين عند ٦٠° س فى فرن مزود بمروحة ذات حركة دوارة للهواء .

٢ - الادينيلايت كيناز + الكرياتين كيناز :

تجرى الطـريقة كما هو مـوضح سابقًا ، فيـما عدا أنه يخلـط أو يوضع ٨ مليمول كرياتـين فوسفات فى محلول المادة التى يعمـل عليها الانزيم ، رغم أن المحاليل الـسابقة قد تخـزن بعدة أسابيع عنـد درجات حرارة التبريـد إلا أنه يتم الحصول عـلى شرائط أكثر حـساسية للـكرياتين كيـناز إذا ما أضيف الكـرياتين فوسفات لمحلول المادة التى يعمل عليها الانزيم فى نفس يوم الاستخدام .

قياس الكثافة البصرية للبصمة :

يجرى فحص الجيل بمقياس الكثافة البصرية (ترانسيدين ٢٩٥٥) عند موجة ضوئية ٦٠٠ نانومتر ، يستعمل جهاز كومبيوتر (تيكترونيكس ٤٠٥٢) بالاشتراك مع مقياس الكثافة البصرية لتقدير مساحة القمة .

نتائج الانزيمات التى جرى بحثها :

عند استخلاص اللحوم المطبوخة عند درجة حرارة ١٠٠° س لمدة ٣٠ دقيقة باستخدام ٦ مول جوانيدين هيدروكلوريد ، وفصلها بالانتشار الفشائى أمام ١ ٪ تريتون أكس - ١٠٠ وتعريضها للجهد الكهربائى المتعادل كما هو موضح سابقًا ، وجد أن تكوين الصبغ (البصمة) لانزيمات معينة ينتج عنها إما عدم وجود شرائط أو شرائط باهتة جدًا بالنسبة لأغلبية الأنزيمات التى درست ، هذه الأنزيمات تشمل الفوسفور جلوكوميتاز ، تريوز فوسفات أيزوميريز إن ايه دى إتش دیانوريز ٦ وفوسفور جليكريت كيناز إلا أن الأدينيلايت كيناز والكرياتين كيناز ينتج عنها علاوة على ذلك ، كما هو موضح فى الشكل رقم (١) فقد نجد أن كل الكثافات الضوئية للشرائط (وليس توزيعها) فى كل نظام أنزيمى قد تأثرت بدرجة حرارة الطبخ .

تركيز الجوانيدين هيدروكلوريد :

عند استخلاص اللحم باستعمال الجوانيدين هيدروكلوريد عند تركيز يتراوح ما بين صفر إلى ٦ مول ، لم يحدث تغير معنوى فى كثافة معظم شرائط الادينيلات كيناز ، هذا يوضحه شكل رقم (٢) حيث نجد متوسط مساحات قمم مقياس الكثافة الضوئية بالنسبة لخمس أصناف حيوانية قد تحددت بيانيا مقابل تركيز هيدروكلوريد الجوانيدين - شكل (٢) علاوة على ذلك يظهر أن

اللحم المطبوخ عند ١٠٠° س لمدة ٣٠ ق والمستخلص بـ ٦ مول جوانيدين هيدروكلوريد يعطى مساحات قمم للادينيلات كيناز ليست مختلفة بدرجة كافية عن قيم المادة الأصلية (الخام) . ولكن لوحظ نقص واضح فى مساحة القمة بالنسبة للجوانيدين هيدروكلوريد ، ومن ثم يتطلب الأمر وجود تركيزات عالية من الجوانيدين هيدروكلوريد لاستخلاص الأدينيلات كيناز المتجمع بالحرارة نتيجة طبخ اللحم .

درجة حرارة الطبخ :

بالنسبة للحم المطبوخ عند درجات حرارة تتراوح بين ٦٠ إلى ١٢٠° س والمستخلص بـ ٦ مول جوانيدين هيدروكلوريد والمعرض للجهد الكهربائى المتعادل نجد أن شدة أو كثافة الصبغة (البصمة) لمعظم شرائط الادينيلايت كيناز قد تم إيضاحها فى شكل رقم (٣) . حيث متوسط مساحات قمم مقياس الشدة البصرية بالنسبة لأربعة أصناف من اللحم قد خططت أمام درجة حرارة الطبخ بالنسبة للأدينيلات كيناز لا يوجد نقص معنوى فى مساحة القمة حتى ١٠٠° س ولكن تنقص المساحة بمقدار ٥٠ ٪ من القيمة الأصلية عند ١١٥° س وحتى ١٠ ٪ عند ١٢° س . وعند درجة حرارة طبخ أعلى من ذلك ينتشيط أنزيم الكرياتين كيناز بصورة أبطأ عند استعادة نشاطه عند أنزيم الادينيلايت كيناز ولم يمكن استعادة درجة نشاط انزيم الكرياتين كيناز بعد الطبخ عند درجة حرارة أعلى من ١١٠° س بالطريقة المستخدمة .

تمييز أصناف اللحم بواسطة صبغ انزيم الادينيلات كيناز :

بالنسبة للحم الخام (كينة . كرس ١٩٨٢) يمكن تمييز عدد من الأصناف من اللحم المطبوخ كما هو موضح فى شكل (٤) بواسطة الصبغ (البصمة) على الجيل المتعادل كهربائيا بانزيم الادينيلات كيناز مثل لحم البوسوم ،

الكنجارو الأحمر والكنجارو الرمادى ، الجاموس ، الجمل ، القطط ، الكلاب، الخيل ، الحمير ، كل هذه الأصناف لها شرائط تتركز بؤرتها عند نقط ذات تعادل كهربائى أقل من البقر ، بينما الادينيولايت كيناز للحم التركى ، الدواجن والأرانب . نجد أنه يثبط عند نقاط تعادل كهربى أعلى من البقر الشكل رقم (٥) يوضح كيف يمكن اكتشاف عدد من الملوثات (بلوحوم أخرى) مخلوط مع لحم البقر (المطبوخ عند ١٠° س لمدة ٣٠ ق) ، غش لحم البقر بنسب تتراوح من ١ : ٢٠ يعطى شرائح مكثفة رغم أن لحم البط والأميو (طائر أصغر من النعام) لم يمكن تمييزه فى لحم البقر كما يتضح بالشكل رقم (٤) إلا أن اختيار مدى غير كبير من الاس الهيدروجينى (كما هو فى شكل ٦) يسمح لهذه الأنواع الثلاثة بأن (تتميز) تتفرد عند الصبغ بانزيم الأدينيلات كيناز .

تميز انواع اللحم بالصبغ بانزيم كرياتين كيناز :

علاوة على ذلك يبين شكل (٦) أنظمة الكرياتين كيناز للبقر والخنزير والأغنام مختلفة عن بعضها . ومن ثم يمكن من تمييز هذه الأصناف ، إلا أن على العكس من ذلك بالنسبة للادينيلات كيناز الذى يتكون من وزن ذرى وحيد لعديد الببتيد ٢٢٠٠٠ (هيل وآخرين ١٩٧٤) ، الكرياتين كيناز يتواجد كمركب مزدوج الصبغة الجزئية لسلسلتين من عديد الببتيد كل وزن ذرى ٤١٠٠٠ (بيكرستاف ، بريس ١٩٧٨) هذا يزيد من إمكانية تكوين هجين بين سلاسل عديد الببتيد من أصناف مختلفة عندما تعاد الجزيئات المفككة وغير الملقوفة (الحلزونية) لطبيعتها أثناء الفصل أو الانتشار الفشائى . والشكل رقم (٧) يبين أنظمة أنزيم الكرياتين كيناز بالنسبة لتقدير الغنم والبقر بالإضافة إلى المخاليط الثنائية لهذه الأصناف . إذا لم يتكون صيغ جزئية مزدوجة فإن نظام الشرائط بالنسبة للمخلوط ينبغى أن يكون عبارة عن تجمع بسيط لأنظمة فردية

ومع ذلك نجد فى مخلوط الخنزير مع البقر أن الشريط (h) أكثر شدة عما هو متوقع بالنسبة لتجميع بسيط ولذا من المحتمل أن يكون قد تكون هجين ذو صيغة جزئية مزدوجة من المونوميرز (المركبات الكيميائية المستقلة) للشريط (I) الخاص بالخنزير والشريط (II) الخاص بالغنم ، بالمثل فى مخلوط (الغنم والبقر) نجد أن الشريط (h) أكثر شدة عما هو متوقع بالنسبة لتجميع بسيط ومن ثم من المحتمل أنه يحتوى على هجين أو صيغة جزئية مزدوجة من المركبات الكيماوية الخاصة بالشريط (II) الخاص بالغنم والشريط (III) الخاص بالبقر وجود شرائط الهجين تعقد تفسير النتائج وقد يحول دون التمييز إذا كانت هناك عينة تتكون من مخلوط منفذ من الأصناف أما فى المخاليط الثنائية كما فى شكل (٧) ، فإن التمييز هناك لم (يتأثر) .

العينات التجارية :

نظرًا لأنه يستعاد نشاط أنزيمى الأدينيرات كيناز والكرياتين كيناز بدرجة بسيطة عند درجة حرارة أعلى من ١٢٠ و ١٠٥° س على الترتيب ، لذا فإن الطرق الموجودة فى الوقت الحاضر ليست صالحة بالنسبة لعدد من المعلبات وغيرها من منتجات اللحوم التى تتعرض لدرجة حرارة عالية إلا أنه بالنسبة لعديد من المنتجات التى تطبخ عند درجة حرارة أقل نجد أنه تظهر أنظمة شرائط مناسبة (معقولة) بالنسبة للعينات التى يتم تجميعها من المطاعم المحلية والمطروحة فى منافذ التوزيع بالتجزئة والشكل رقم (٨) يظهر عدد من أنظمة الشرائط المتحصل عليها من عينات اللحم المطبوخ المشترى من المراكز التجارية . علاوة على ذلك يظهر شكل (٨) فى عبوة واحدة من فخذ الخنزير (الهام) أن شرائط الادينيلايت كيناز من عينات اللحم كانت فى مركز العبوة أكثر شدة أو وضوحًا من الأجزاء الخارجية وهذا يعكس الطبخ الزائد الذى حدث للأجزاء الخارجية .

المناقشة :

بالاتفاق مع التقارير المبكرة بالنسبة للادينيلايت كيناز (تسيوبى ، شير فينكا عام ١٩٧٥) وأنزيم الكرياتين كيناز (بيكير ستاف ربريس ١٩٧٨) نجد أن هذا البحث يظهر أن عملية الرنترة لهذه الأنزيمات لـ ٦ مول جوانيرين هيدروكلوريد عند ٢٠ - ٢٣° س تعتبر عكسية بصفة أساسية بشرط أن تؤخذ الاحتياطات المناسبة بصفة عامة أثناء طى البروتينات حلزونيا . إلا أن أنظمة الشرائط ونقطة التعادل الكهربى تتأثر بخطوة الانتشار الغذائى فى هذا البحث على سبيل المثال، أكثر أو أبرز شرطة لانزيم الأدينيلات كيناز بالنسبة للحصان تظهر نقطة تعادل كهربائى أعلى من البقر (انظر شكل ٤ من بحث كينج وكرث (١٩٨٢) ولكن فى هذا البحث فى شكل ٤ تظهر أقل من البقر ، أشياء أخرى مماثلة شاذة بالنسبة لسلوك الهجرة فى المجال الكهربائى للجزئيات ونقطة التعادل الكهربى بالنسبة لانزيم الادينيلات كيناز هذه الأشياء أمكن إيعازها إلى إرتباط الأيونات المتعاكسة (تسيوبى وشيرفينكا ١٩٧٥) عند تعرض الادينيلايت كيناز لمحاليل من مركبات أيونية مختلفة . ومن ثم من أجل تمييز الأصناف ، فإن جميع العينات تحتاج لأن تختزل إلى الوضع الشائع فيما يتعلق بالأيونات المرتبطة . أى ملح. . . إلخ يضاف أثناء تكوين المنتج قد يرتبط بشدة بالادينيلات كيناز ويسبب تغيير نقطة التعادل الكهربائى له ، ولكن فى الطريقة الحالية حيث لا تطوى البروتينات بواسطة ٦ مول جوانيدين هيدروكلوريد ثم تفصل بالانتشار الفشائى، نجد أن مثل هذه الأملاح قد تزال وبالتالى فإن الطريقة الحالية قد تكون من الممكن الاعتماد عليها بدرجة أكثر بالنسبة لمنتجات اللحوم الخام بالإضافة إلى العينات المطبوخة ، أكثر من طريقة المستخلص المائى للعينات التى جرى استخدامها سابقًا (كنج ، كرس ١٩٨٢) .

وفى هذا العمل جرى استكمال المكتشافات السابقة الخاصة بإجراء عملية

عكسية للدنترة بإضافة الجوانيدين هيدروكلوريد إلى الادينيلايت كيناز والكرياتين كيناز المتجمع بالحرارة نتيجة طبخ اللحم (بشرط ألا تكون عوملت بدرجة حرارة عالية جدًا) أسباب الاستعادة القليلة (أقل من ١٠ ٪) لانزيم الكرياتين كيناز وانزيم الادينيلات كيناز بعد ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة ١٠٥° س ، ١٠٢° س على الترتيب تعرف بعد ، ولكن قد ترجع على تغيرات الرابطة التساهمية مثل الدى أميديشن (نزع الاميدات) (كنج ١٩٧٨) وأكسدة مجموعة الثيول (هام ١٩٦٦ م) التى تحدث عند درجات حرارة أعلى .

طريقة تمييز الأصناف الموضحة هنا فى هذا البحث تعتمد على إذابة بروتينات الساركو بلازميك والميوفيريللر بواسطة محاليل الجوانيدين هيدروكلوريد. هذا المذيب يحول كل بروتين - بدون الأخذ فى الاعتبار عما إذا كانت العينة خام أو مطبوخة إلى حالة من التفكك بصفة عامة ويصبح غير منطوى (حلزونى) وباستثناء التغير بصفة عامة الذى يحدث فى شدة أو كثافة الشريط نجد أن هذه الطريقة ستتفادى مشكلة تغير أنظمة الشرائط مع درجة الحرارة فى الجيل المصبوغ من النوع الكوماس كما هو فى طريقة تينيرجن والمسان (١٩٧٦) وبابيكر وآخرين (١٩٨١) نجد أن بعض الشرائط تبهت بينما تظهر أخرى جديدة عندما تزيد حرارة الطبخ ومن ثم إن التفسير قد أصبح معقدًا بالنسبة لأنظمة الشرائط التى تتوقف على درجة الحرارة وأيضًا على نوع أو صنف الحيوان .

علاوة على ذلك الصبغة الانزيمية تعطى فرق واضح بين الأصناف عن التى تحدثها الكوماس بلو لأن :

أ) كل صبغة أنزيمية تعطى شريط واضح فقط (أدينيلايت كيناز) أو عديد (كرياتين كنياز) .

ب) هناك إختلاف واضح بين الأصناف فى نقط التعاون الكهربى هذه الانزيمات .

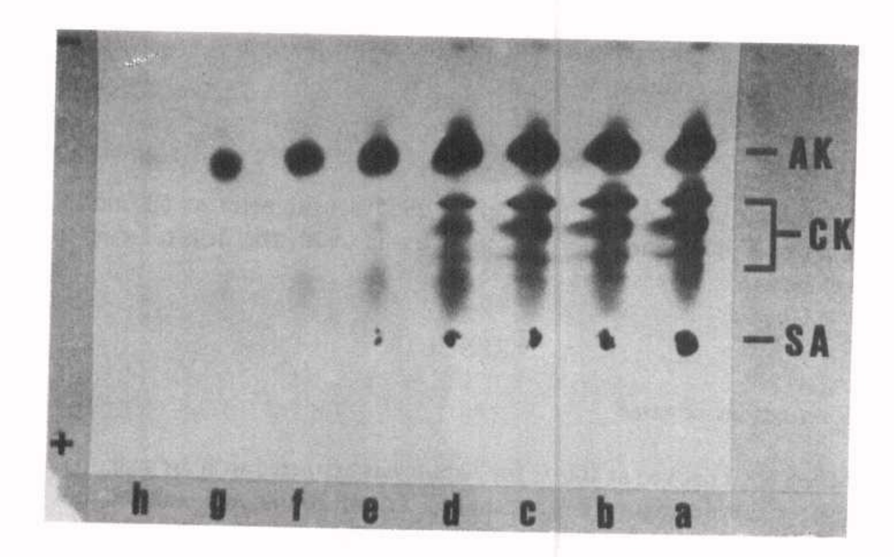


Fig. 1. Isoelectricfocusing gel (containing Pharmalyte 5 - 8 ampholytes) stained for creatine kinase (CK) plus adenylate kinase (AK). Non-migrating protein stained at the position of sample application (SA). Sheep samples were heated for 30 min at the following temperatures : a. raw: b. 60 °C: c, 80 °C: d. 100 °C: e. 105 °C: f. 110 °C: g, 115 °C: h. 120 °C.

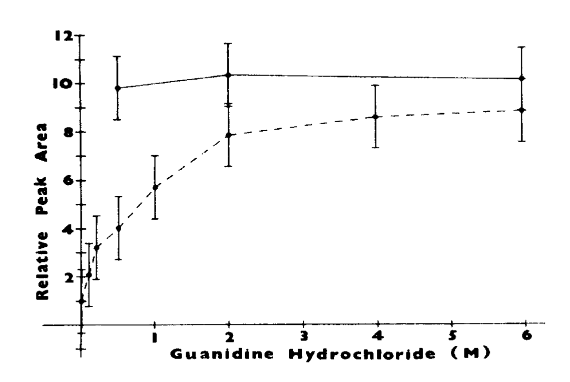


Fig. 2. Relative peak areas (calculated from densitometer scans of isoelectricfocusing gels stained for adenylate kinase) as a function of the concentration of guanidine hydrochloride in the solution used to extract meat samples: (a) raw (——); (b) heated at 100 °C for 30 min (- - - -). Each point (●) corresponds to a mean area averaged over data from buffalo , camel, red kangaroo , cattle and sheep meats. Vertical lines represent the least significant difference for comparison between means at the 5% confidence level.

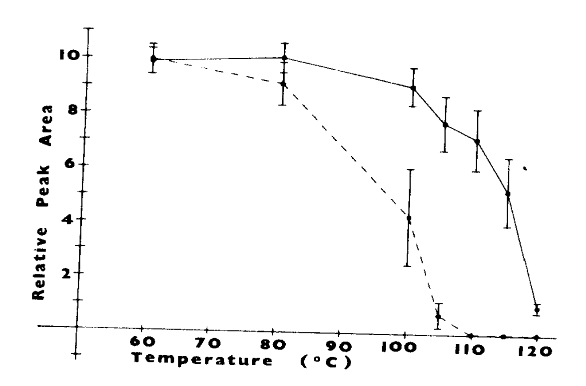


Fig. 3. Relative peak areas for adenylate kinase (___) and creatine kinase (- - - -) calculated from densitometer scans of isoelectricfocusing gels as a function of the temperaturc at which meat samples were heated for 30 min. Samples were extracted with a solution containing 6M guanidine hydrochoride and processed as described in the Methods section Each point (●) corresponds to a mean area averaged over data from sheep. pig. cattle and bulfalo meats. Vertical lines represent standard deviations.

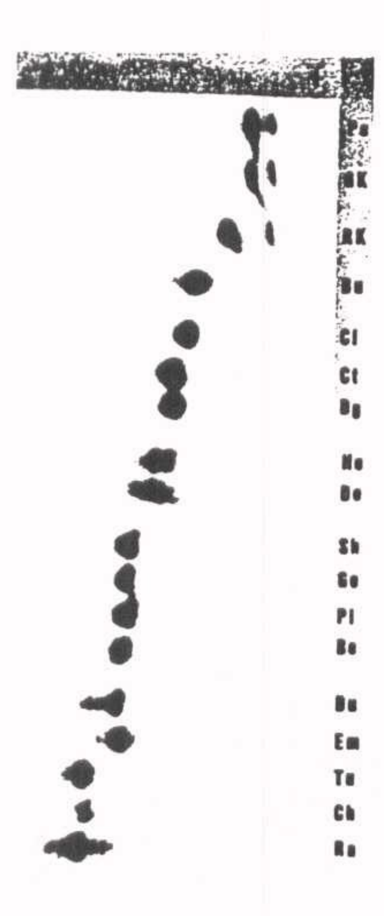


Fig. 4. Iesoelectricfocusing gel (containing 1.3 ml Pharmalyte 5 - 8 and 0.2 Pharmalyte 8 - 10.5) stained for adenytate kinase. Each meat sample was heated at 100 °C for 30 min. The extractoin solution contained 6M guanidine hydrochloride. Po. possum: GK grey kangaroo; RK. red kangaroo; Bu. buffalo: Cl, camel; Ct, cat; Dg; dog; Ho. horse: Do. donkey: Sh.sheep: Go goat; Pi. pig: Be. beef: Du. duck; Em emu: Th, turkey: Ch. chicken: Ra. rabbit.

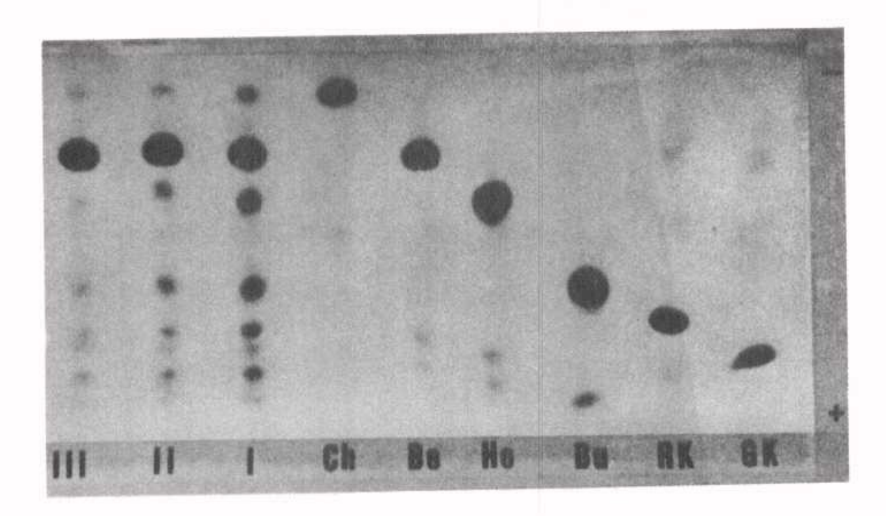


Fig. 5. Iesoelectricfocusing gel (containing 1.3 ml Pharmalyte 5 - 8 and 0.2 Pharmalyte 8 - 10.5) stained for adenytate kinase. Each meat sample was heated at 100 °C for 30 min. GK grey kangaroo; RK. red kangaroo; Bu. buffalo: Ho. horse: Be, beef: Ch, chicken: i, mixture containing five parts of beef and one part each of the other five species (i. e. 50% beef); iii, mixture containing ten parts beef and one part each of the other five species (i. e. 67% beef): iii, mixture containing twenty parts of beef and one part each of the other five species (i.e. 80% beef).

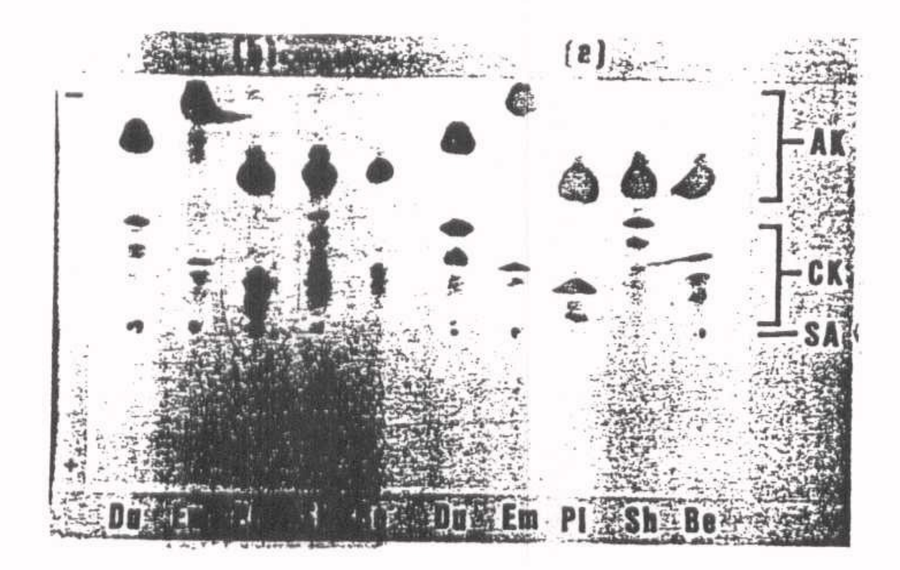


Fig. 6. Iesoelectricfocusing gel (Pharmalyte 5 - 8 ampholytes) stained for adenylate kinase (AK) plus creatine kinase (CK) Some nom-migrating protein stained at the position of sample application (SA) Be, beef; Sh, sheep; Pi, pig; Em, emu; Du duck. a, Raw; b, meat heated at 100 °C for 30 min .

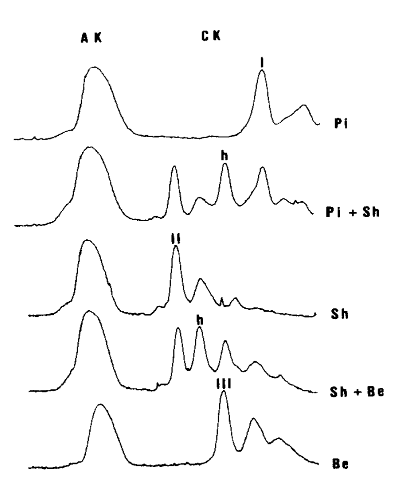


Fig. 7. Densitometer acans of an isoelectricfocusing gel (Pharmalyte 5 - 8 ampholytes) stained for adenylate kinase (AK) plus creatine kinase (CK). All samples raw. Pi, pig; Sh, sheep, Be, beef; Pi + Sh, pig: sheep (1 : 1) - band h is a hybrid CK dimer formed from pig (band I) and sheep (band II). Sh + Be, sheep: beef (1 : 1, band h contains a hybrid CK dimer formed from sheep (band II) and beef (band III) .

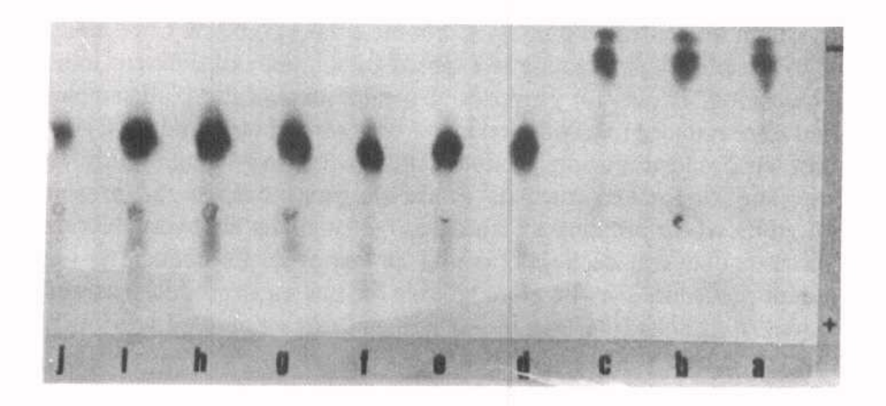


Fig. 8. Isoelectricfocusing gel (containing 1.2 ml Pharmalyte 5 - 8 and 0.3 ml Pharmalyte 8 - 10.5) stained for adenylate kinase. a, Chicken standard (100 °C, 30 min); b, chicken roll; c, chicken express; d, pork burger; e pig standard (100 °C, 30 min); f, bacon pie; g, pork roll; h - j, canned ham, sampled from centue h; inner portion, i; outer portion, j.

استخدام هيستيدين ثنائى الببتيدات
فى تقدير كمية لحم الخنزير فى اللحوم المصنعة

كادنيجى . كولين . اليك

مدرسة الزراعة جامعة تروب بيونرورا فيكتوريا استراليا ١٩٨٤(*)

اساس الطريقة :

يستعمل جهاز الكروماتوجراف السائل ذو الأداء العالى على عمود بارتيزيل ١٠ - SCX ويعتبر كبديل تقليدى لتغيير أيون الكروماتوجراف لتعيين كمية الهيستيدين ثنائى الببتيدات وانسرين وكارنوسين والبالنين فى تقدير كمية لحم الخنزير المصنعة لأن نسبة ثنائى الببتيدات فى لحوم الخنزير تختلف عنها فى بقية لحوم أنواع الحيوانات الأخرى .

الأجهزة والكواشف والمواد :

- عينات من لحوم الخنزير والبقر والدواجن واللحوم المصنعة .
- محلول ملحى من كلوريد الصوديوم .
- حمض سلفوساليسيلك .
- محلول سيترات الصوديوم .
- جهاز كشاف فلورسنتى مائى .
- جهاز كروماتوجراف السائل ذو الأداء العالى .
- محلول فورمات الليثيم .

(*) المصدر (Carnegie et al 1984)

- محلول ٥ - فثالديالدهيد (OPA) .
- صواني تفلون .

طريقة العمل :

١ - استخلاص اللحوم المصنعة :

يخلط لحم الخنزير بـ ١٠ ٪ من لحوم البقر أو الدجاج أو الغنم يؤخذ ٣٠ جرام من الخليط ويصنع على هيئة فطائر ثم توضع فى صوانى من التفلون وتغطى بالورق المفضض وتطبخ فى فرن درجة حرارته ١٨٠° س لمدة ٣٠ دقيقة .

توضع الصوانى فى مجمد الثلاجة حتى يستخلص اللحم المفروم المطهى الموجود بها بمحلول متجانس ٣٠ مليلتر ٠,٩ ٪ محلول ملحى ويتبع بإضافة ١٢٠ مليلتر ١٠ ٪ حجم/ وزن حمض سلفوساليسيلك ويضاف إليها ماء لإحلاله مكان الفاقد من التبخير .

يوضع المحلول فى أنابيب الطرد المركزى ثم توضع فى جهاز الطرد المركزى وتدور عند ١٠,٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة ساعة ويرشح السائل الطافى ويخزن عند درجة حرارة - ٢٠° س حتى حين استخدامه فى التحليل .

وقبل وضع العينات فى جهاز الكروماتوجراف السائل ذو الأداء العالى توضع العينات فى درجة حرارة الحجرة لمدة كافية حتى تأخذ درجة حرارة الحجرة ثم توضع فى أنابيب جهاز الطرد المركزى وتدور عند ٥٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة أربعة دقائق ونصف .

ملحوظة : عينات اللحوم المصنعة يعمل منها عينتين كل منها ٣٠ جرام وتستخلص كما سبق شرحه .

٢ - جهاز الكروماتوجراف لثنائى الببتيدات :

يوضع ٥ ميكرولتر من المستخلص فى عمود بارتيزيل ١٠ - CX مع ٢, ٠ إم فورمات الليـثيم عند اس هيدروجينى ٢,٩ عند درجة حرارة ٤٠ س ومعدل إنسياب ٠,٧ مليلـتر / دقيقة . يتفاعل المزاح مع الكاشف (٥ - فـثالديالدهيد (OPA) عند درجـة حرارة ٣٠° س ثم تعين مشـتقات ثنائى الببتـيدات بواسطة جهاز كـاشف فلورســنتى مائـى موديل ٤٢٠ والمحلـول الذى يخرج مـن جهاز الكاشف الفلورسنتى يكمل مكانه أوتوماتيكيا بجهاز هولت باكارد (٣٣٩٠ أ) .

النتائج :

فصل الهيستيديــن ثنائى الببتيدات من اللحوم بطريقـة جهاز تحليل الحامض الأمينى وبطريقة جهاز الكروماتوجراف السائل ذو الأداء العالى (HPLC) .

وجد أن الطريقة الثانية (HPLC) أسرع ١٦ مرة عن الطريـقة الأولى وأكثر دقة وذلك لأن المحـلول الخارج من جـهاز الكشاف الـفلورسنتـى يكمل نـفسه أوتوماتيكيًا .

وكمـا أن الكواشف فـى طريقة جـهاز الكرومـاتوجراف الســائل ذو الأداء العالى أقل بكثير عنها فى الطريقة الأولى .

الرسم رقــم (١) يبين فصل هيـستيدين ثنـائى الببتـيدات فى مستخـلصات اللحوم المطهية من الخنزير والبقر وخليط من الاثنين .

تطبيق التجربة لمعرفة المخاليط المختلفة من اللحوم المعروفة :

الجدول رقم (١) يعطى نتائج التحليل لعينات اللحوم المختلفة وفى شكل ٢ ، ٣ تبين المنحنيات الموجودة بها الحقائق العلمية المستخدمة وفى شكل (٢) يتبين فيها نسبة البالغين / أنسرين المتحصل عـليها من خليط لحوم الخنزير بلحوم البقر

وحوالى الغنم والدجاج وفى شكل رقم (٣) يـرى نسبة كارنوسين/ أنسرين فى خليط هذه اللحوم .

جدول رقم (١) يبين متوسط الهيستيدين ثنائى الببتيدات

فى لحوم مختلف الحيوانات (ميكرومول / جرام مادة جافة)

نوع اللحوم	الكمية الكلية	انسرين	كارنوسين	بالنين	بالنين / انسرين	انسرين / كارنوسين
الخنزير « أ »	٦٢,٤ (١٥,٨)[ب]	٢,٧ (١,-)	٥٦,٩ (١٤,٨)	٢,٨ (١,٥)	١,-	٢١,-
الدجاج « جـ »	٥٩,١ (١٣,٧)	٣٨,٦ (٧,١)	٠,٣ (٠,٠٩)	٠,٣ (٠,٠٩)	٠,٠١	٠,٥٢
البقر « د »	٥٩,٢ (٤,٣)	٨,٦ (١,-)	٠,٣ (٠,٠٦)	٠,٣ (٠,٠٦)	,٠٣	٥,٨
الغنم « و »	٤١,٣ (١٢,٧)	٢٠,٦ (٧,٣)	٠,٤٥ (٠,٢٥)	٠,٤٥ (٠,٢٥)	,٠٢	١,-

أ = متوسط ١٢ عينة من لحوم الخنزير .

ب = رقم الإنحراف المعيارى .

جـ = متوسط ثلاث عينات من الصدر وثلاث أرجل من الدجاج .

د = متوسط عينة من وجه الفخذ وعينة من لحم الساق بين الركبة والحافر من البقر .

و = متوسط ٢٤ عينة من أرجل ، ٢٤ من كتف ، ٢٢ حوالا الغنم ، ٢ عينة من غنم بالغ .

التطبيق على عينات منتجات اللحوم التجارية :

بالنين يوجد بنسبة عالية فى لحوم الخنزير عنها فى اللحوم الأخرى وبسهولة يمكن التعرف على لحوم الخنزير المخلوط بلحوم الحيوانات الأخرى . وكذلك تختلف تركيزات الهيستيدين ثنائى الببتيدات فى مختلف عضلات الخنزير .

ولتعيين نسبة لحوم الخنزير فى خليط اللحوم المختلفة ولتعيين مصدر اللحوم الأخرى فى منتجات اللحوم يجب أن تتبع الخطوات الآتية :

١ - النتائج المتحصل عليها من الهيستيدين ثنائى الببتيدات يحسب بالميكرومول/ جرام مادة جافة وإذا كانت نسبة البالنين/ أنسرين أكبر من ٠,٠٥ يدل على وجود لحم الخنزير بكمية كافية .

٢ - من الشكل رقم ٢ يمكن تعيين كمية لحوم الخنزير بالتقريب من نسبة بالنين/ أنسرين .

٣ - من الشكل رقم ٣ نسبة الكارنوسين / أنسرين يمكن بها تعيين مصدر لحوم الحيوانات المخلوطة بلحم الخنزير .

٤ - تقدير كمية اللحوم كما يأتى :

اللحوم الحمراء = (المجموع الكلى هيستيدين ثنائى الببتيدات) / (المجموع الكلى للهيستدين ثنائى الببتيدات المحسوب لخليط من اللحوم مقدرة لكل الأنواع

المعلومات المتحصل عليها ينظر إليها على أنها نصف الكمية وذلك لعديد من الصعوبات التى لا يمكن تحايها وهى :

١ - يوجد عديد من الاختلافات بين عضلات لحوم الحيوانات التى من نفس النوع .

٢ - البالنين يزيد كلما زاد عمر الحيوان (وإذا زاد عمر حيوان الخنزير عن ٣ سنوات يحدث بعض الانحرافات فى البالنين) .

يمكن إكتشاف أنواع اللحوم فى خليط من لحوم البقر ، الغنم ، مع لحم الخنزير وذلك بأن يشبه الكارنوسين/ الانسورين تقل وتأخذ وضعًا متقاربًا كما فى شكل ٣ وتوجد صعوبة فى تقدير كمية اللحوم فى الخليط .

فمثلاً نجد أن نسبة البالنين/ أنسرين (صفر) ونسبة الكارنوسين/ أنسرين (٩٣) فى لحوم الخيول وفى لحم الكانجارو (١ , ٠) وهذه النسبة تختلف عن نظيرتها فى لحوم البقر والغنم وبذلك يمكن عدم اكتشاف اللحوم المخلوط مع لحم الخنزير .

وبتحليل عديد من منتجات اللحوم المخلوطة بلحم الخنزير لمعرفة كميات الهيستيدين ثنائى الببتيدات مبين بالجدول ٢ .

ويمكن تقدير كمية اللحوم بطريقة إجمالية بمقارنة وجود الهيستيدين ثنائى الببتيدات الكلى بكمية اللحوم الحمراء المتوقعة فى الخليط وكثيرًا من منتجات اللحوم تحتوى على نسبة قليلة من اللحوم الحمراء .

وطريقة جهاز الكروماتوجراف السائل ذو الأداء العالى هى الطريقة الموضوعية للكشف عن أنواع اللحوم فى مخاليط منتجات اللحوم عن طريق تقدير الهيستيدين ثنائى الببتيدات .

جدول رقم (٢) يبين الهيستيدين ثنائى الببتيدات

فى لحوم الخنزير المصنعة المخلوطة بأنواع مختلفة من اللحوم

المنتج ومصدره	الكمية الكلية	انسرين	كارنوسين	بالنين	بالنين انسرين	كارنوسين انسرين	تعليق على حصة اللحوم	دليل مقياس اللحوم الحمراء
مقانق خنزير								
جنوب ويلز الجديد	١٥,٩	٠,٦٣	١٤,٥	,٧٣	١,٢	٢٣	-١,٠ خنزير	٠,٢٥
غرب استراليا	٨,٢	١,٢	٧,-	--	--	٥,٨	-خنزير ، ٠,١ بقر	٠,١٤
تاسمانيا	٨,٣	٢,٤	٥,٦	٠,٣	٠,١٣	٢,٣	٤٥, خنزير ، ٠,٥٥ غنم	٠,١٦
لحم فخذ الخنزير ودجاج ،								
لحوم اللانشون								
غرب استراليا	١٥,٤	١,٦	١٣,-	٠,٧٦	,٠٤٨	٨,١	٠,٩ خنزير ، ٠,١ دجاج	٠,٢٥
فيكتوريا	٩,٣	١,٧	٧,٣	٠,٢٨	٠,١٦	٤,٣	٠,٨ خنزير ، ٠,٢ دجاج	٠,١٥
كوين سلاند	٦,٨	١,٨	٤,٩	٠,١٠	٠,٠٦	٢,٧	٠,٤ خنزير ، ٠,٦ دجاج	٠,١١
منتجات متنوعة								
وجه الفخذ فرنز جنوب استراليا	٨,٣	٠,٧١	٧,٢	٠,٤٣	٠,٦١	١٠,١	٠,٩ خنزير ، ٠,١ غنم	,١٤
هامبرجر خنزير غرب استراليا	٧,٩	١,٣	٦,٥	٠,١٠	,٠٨	٥,-	٠,٢ خنزير ، ٠,٨ بقر وغنم	٠,١٤
لحم خنزير ألمانى تاسمانيا	٥,٦	٢,٢	٣,٢	٠,١٥	,٠٧	١,٥	٠,٢٥ خنزير ، ٠,٧٥ غنم	٠,١٢

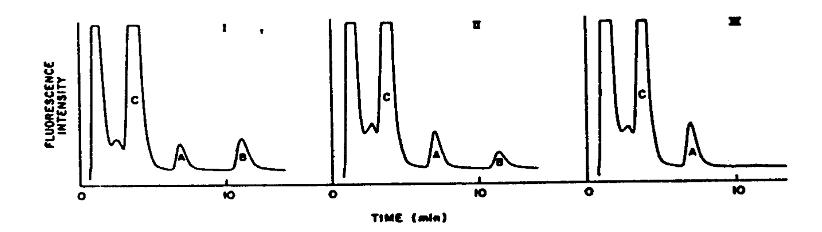


Fig. 1. Typical chromatorgam from separation of extracts of meat by HPLC on a Whatman Partisil - 10 SCX column with 0.2 M lithium fprmate pH 2.9. The figure was drawn from the output of a Hewlett Packard Integrator. I, cooked pork; II, cooked 50 - 50 mixture pork and yearling beef; III, cooked yearling beef. A, anserine; B, balenine; C, carnosine.

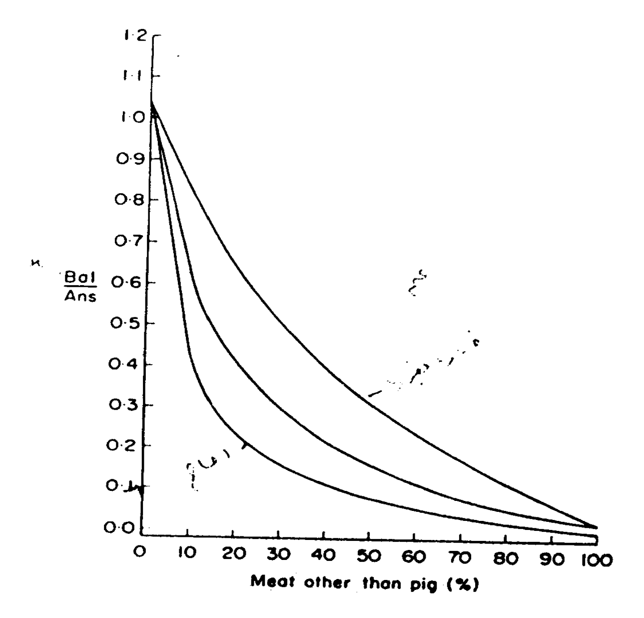


Fig. 2. Calculated variation in balenine/anserine ratio when pig meat is mixed with meat from cattle (upper line), sheep (middle line) and chickens (lower line). Analysis of experimental mixtures produced curves close to the calculated lines.

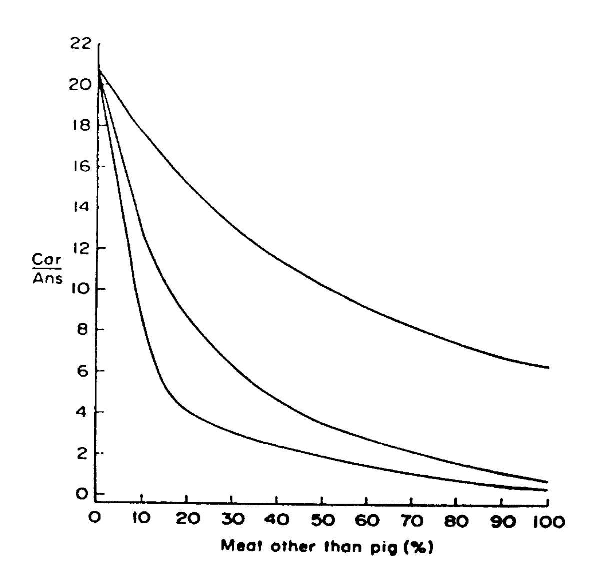


Fig. 3. Calculated variation in carnosine/anserine ratio when pig meat is mixed with meat from cattle (upper line), sheep (middle line) and chickens (lower line). Analysis of experimental mixtures produced curves close to the calculated lines.

تحليل الميوجلوبين للكشف عن لحوم البقر والخنزير والخيول والغنم والكانجارو فى منتجات اللحوم المخلوطة

جانسين . هاجيل . فوبوستيل . باچى ١٩٨٧(*)

اساس الطريقة :

هذه الطريقة تستخدم فى الكشف عن عديد من أنواع لحوم الحيوانات فى منتجات اللحوم المطهية . بروتينات اللحوم تذاب فى مذيب يحتوى على ٨ إم يوريا وثنائى ثيوإريثريتول وتفصل بالبصمة الكهربائية على طبقة فوق الرقيقة للجيل عديد أكريلاميد والمحتوى على اليوريا . ثم ينقل البروتين إلى النيتروسليلوز بالبصمة الكهربائية وتحضن البصمة فى مصل مضاد ميوجلوبين الإنسان والمرتبط بالأجسام المناعية وبيروكسيدير ومضاد البيروكسيديز (PAP) المناعى المركب وانزيم الكاشف (substrate) .

وهذه الطريقة تستخدم فى الكشف عن أقل من ١٠ ٪ من لحوم الخنزير والخيول والغنم والمختلطة أساسًا بلحوم البقر وعوملت حراريًا عند درجة حرارة ١٢٠° س لمدة خمسة دقائق .

وهذه الطريقة غير مناسبة للكشف عن لحوم الدجاج والرومى لأن الميوجلوبين بها منخفض .

المواد والكواشف :

١ - منتجات اللحوم المطحونة من البقر والخنزير والغنم والخيول وخالية من الدهون والأوتار .

(*) المصدر Janssen et al, 1987 .

٢ – اللحوم الحمراء تقطع وتفرم جيدًا وتخلط بالإضافات الموجودة فى الجدول رقم (١) ومخاليط اللحوم كما يأتى : لحم بقر – لحم خنزير ، لحم بقر – لحم غنم ، لحم خنزير – لحم غنم .

كل منها بنسبة ٩٠ ٪ إلى ١٠ ٪ ، ٧٥ ٪ إلى ٢٥ ٪ ، ٥٠ ٪ إلى ٥٠ ٪ .

٣ – تسخن ٥ جرام من المخلوط فى كيس بلاستيك مفلطح عدد مختلفة وفى درجات حرارة مختلفة فمثلا ١٥ دقيقة عند ٨٠° س ، ١٥ دقيقة عند ١٠٠° س فى حمام مائى ، ٥ دقيقة فى الأوتوكلاف عند درجة حرارة ١٢٠° س بعد التسخين يبرد الكيس بماء الصنبور الجارى ويخزن عند درجة حرارة – ٢٠° س .

ملحوظة : لحوم الكانجارو تعامل عينة واحدة فقط لمدة ١٥ دقيقة عند درجة حرارة ١٠٠° س .

فى التجارب المنفصلة لمنتجات اللحوم (الخنزير والبقر) المصنعة بـ ٢ ٪ لاكتوز أو ٢ ٪ جليلكوز والمعاملة حراريا عند درجة حرارة ١٠٠° س لمدة ١٥ دقيقة للكشف عن تأثير التوابل الغير انزيمية على جهد متساوى (electrophoretic) .

٤ – بلازمة دم الخنزير المجففة .

٥ – المنتجات الأخرى من اللحوم تشترى من السوق .

٦ – ضد المصل (antisera) .

ضد ميوجلوبين الإنسان المتحصل عليه من الأرانب ضد ميوجلوبين IgG الأرانب والمتحصل عليه من الخنزير بيروكسيديز ومضاد البيروكسيدز للأرانب (PAP) .

٧ - الكواشف الأخرى :

- اكريلاميد ون ون - مثيل نبيساكريلاميد (Bis) .
- ثنائى ثيواريريتول (DTE) .
- توين ٢٠ .
- أمفولايت (سرفاليت) درجة أس الهيدروجينى ٦,٥ - ٩ .
- تريز (هيدروكس مثيل - أمينوميثان) .
- جليسرين .
- يوريا .
- ٤ - كلورو - ١ - نافثول .
- نيتروسليلوز ذو فتحات ٠,٢ ميكرمتر .

جدول (١) - اللحوم والإضافات

	٪
لحوم	٨٩
ملح تخليل (٩٩,٤ ٪ كلوريد صوديوم ، ٠,٦ ٪ صوديوم نيتروز)	٢
نشا بطاطس	٤
اريثودبات صوديوم	٠,٠٥
ماء	٥
بيروفوسفات صوديوم	٠,٣

طريقة العمل :

١ - تحضير العينة :

يوزن ٥ - ١٠ جرام من منتجات اللحوم وتوضع فى خلاط لمدة دقيقة واحدة مع ٥٠ مليلتر مذيب مائى يحتوى على ٨ إم يوريا ، ١ , ٠ ٪ DTE ثم يوضع المحلول فى جهاز الطرد المركزى ويدور عند ٤٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة خمسة دقائق . ينقل ١٠٠ ميكرولتر من السائل الطافى إلى الحفر ٩٦ الموجودة فى صوانى من البولى ايسترين وتغلق جيدًا .

العينة المرجعية تعامل تمامًا فى نفس ظروف التجربة .

البصمة الكهربائية :

تعمل البصمة الكهربائية على جهاز LKB التروفور ٢٢١٧ ، بولى اكريلاميد جيل (٥ ٪ اكريلاميد ، ١٥ , ٠ ٪ بز) ٢٦٠ × ١٢٥ × ٢٥ , ٠ مليمتر ويوضع على الجانب المائى للصفائح المعدنية (hydrophopic side) . الجيل يحتوى على ٦,٥ إم يوريا ، ٣ ٪ خليط من أمفوليتات (سرڤاليت ٣ - ١٠ ، ڤارماليت ٦,٥ - ٩ بنسبة ٥ : ١) . محلول القطب الموجب يشتمل على ثلاثى هيدروجين فوسفات ($H_3 PO_4$) . ومحلول القطب السالب يحتوى على صوديوم هيدروكسيد بعد عمل البصمة الكهربائية عند ٣ وات لمدة ١٥ دقيقة . ١ - ٢ ميكرولتر من العينة أو المستخلص توضع على الجيل على بعد ١,٥ سم من القطب الموجب . والبصمة الكهربائية تتم بعد ١,٥ ساعة عند ٦ وات ، ٨٥٠ ڤولت ، ويصل الڤولت عند نهاية التجربة حتى ٢٠٠٠ - ٢١٠٠ .

٣ - البصمة :

البروتـين المنقول إلى النـيتروسليلـوز بواسطة البؤرة الـكهربائية بـعد إزالة الأقطاب وشرائح العيـنات . توضع ورقة ترشيح بلطف علـى الجيل لمدة دقيقة ثم ينزع الجيل من الشرائح المعدنية للبولى ايستر . ورق نشاف الجيل توضع فى حينية تحـتوى على مـحلول محايـد ناقل (٢,٨ جـرام ترز (هيدروكس مـثيل) أمينـوميثان ، ١٥ جرام جـليسين ، ١٠٠ مليلتر مـيثانول/ لتر) . تـبلل ورقة الترشية أولا بالمحلـول المحايد الناقل وذلك لمنع وجود فقاقيـع هوائية بين الجيل وورق الترشيح . توضع قطعة البولى ايسـتر على الحاجز عند قمة سطح الجيل ثم تتبـع بقطعة من نيـتروسليلوز . وفائدة الحـاجز يحمى الجيل مـن الالتصاق بالصفائح المعدنية لـلنيتروسليلوز بعد عملية البصمـة . ثم توضع ورقة الترشيح بين قطعـتى سفنج داكرون علـى هيئة ساندوتش وتـعلق فى كاسيت ثـم يغمس الكاسيت فى الوعاء الموجود به المحلول المحايد الناقل وتترك البصمة طول الليل عند ڤولت ٤٠ . ثم تغسـل الصفائح المعـدنية للنيتـروسليلوز بالمحـلول المحايد المقف (blocked) (٢,٥٦ جرام ثنائى صـوديوم فوسفات $Na_2\ HPO_4.\ 2H_{20}$ ٠,٨٧ جرام إحـادى صوديوم فوسـفات $Na\ H_2\ PO_4.\ 2H_{20}$ ، ١٨ جـرام كلوريد صوديوم ، ٦ مليلتر توين ٢٠ لكل ٢ لتر لمدة ١٠ دقائق .

٤ - الصبغة :

الصـبغـة المختـارة التـى تحصـل علـيهـا بواسـطة بـيروكـسيـديز ومـضاد البيـروكسيديز . جـميع تخفيـفات مضادات الأمصـال حضرت بالمحلـول المحايد المقفل (blocked) فى الحفـر البلاستيـكية والمقفولـة جيدًا بالحرارة بـعد وضع بصمة الـنيتروسليلـوز وإضافة ١ مليلتـر من محلول التحـضين/ ٢٠ سم٢ من الرقائق المعدنية للنيتروسليلوز. المحلول الكاشف (substrate) يحضر بإذابة ٢٥ مليلجرام ٤ - كلـورو - ١ - نافثول فى ١٠ مليلتر إيثانول ويـضاف ٤٠ مليلتر

ترز/ محلول محـايد من حمض الهيدروكلوريك (١,٠ إم ، اس هيدروجينى ٧,٦) ، ١٠ ميكرولتر ماء أكسجين (٣٠ ٪) .

والتتابع التالى فى الخطوات للتحضين يستخدم كما يلى :

١ - ضد ميـوجلوبين الإنسـان المتحصل عـليه من الأرانب يـخفف ١ : ٢٥٠ ويترك لمدة ١٥ دقيقة .

٢ - يغسل بمحلول المحايد المقفل (blocked) (٤ × ١ دقيقة) .

٣ - ضـد ميوجلـوبين IgG الأرانـب والمتحصـل عليه مـن الخـنزير يخفـف ١ : ١٠٠ ويترك لمدة ١٥ دقيقة .

٤ - يغسل بمحلول المحايد المقفل (blocked) (٤ × ١ دقيقة) .

٥ - البيروكـسيدير ومضاد الـبيروكسيديـز للأرانب (PAP) يـخفـف ١ : ٢٥٠ ويترك لمدة ١٥ دقيقة .

٦ - تعاد الخطوة رقم ٢ .

٧ - يغسل بمحلول ترز/ محلول محايد من حمض الهيدركلوريك (٠,٠١ إم، اس هيدروجينى ٧,٦) (٤ × ١) دقيقة .

٨ - التحضين بالكاشف (substrate) ماء أكسجين، ٤ - كلورو - ١ - نافثول.

النتائج والمناقشة :

النتيجة كما فى شكل ١ ، ٢ يتبين فيها المخاليط المزدوجة ونسبتها ودرجات الحرارة التى تعامل بها .

يلاحظ أن الميوجلوبينات من مختلف أنـواع اللحوم يظهر بدرجات مختلفة نتيجة تفاعلـه مع نهد ميوجلوبين الإنسان وهذا التفاعل لـه علاقة بعلم الحيوان الوراثى .

كما يوجد فى عديد من أنواع اللحوم أنها تحتوى على أكثر من بروتين متحد مع ضد ميوجلوبين الإنسان وذلك لوجود مشابه للميوجلوبين (mypglobin isomers) .

وهذه الطريقة غير مناسبة للكشف عن لحوم الدجاج والرومى لأن الميوجلوبين بها منخفض أو المنتجات التى عوملت بالحرارة بشدة وأيضا هذه الطريقة لا تستخدم فى اكتشاف لحوم الأرانب وذلك لأن ضد ميوجلوبين الإنسان المستخدم ينتج فى الأرانب كما وجد أن شدة لون أشرطة الميوجلوبين لا تعتمد على قوة التسخين فقط ولكن على عوامل أخرى تؤثر فى ميوجلوبين الحيوان مثل التغذية والنمو .

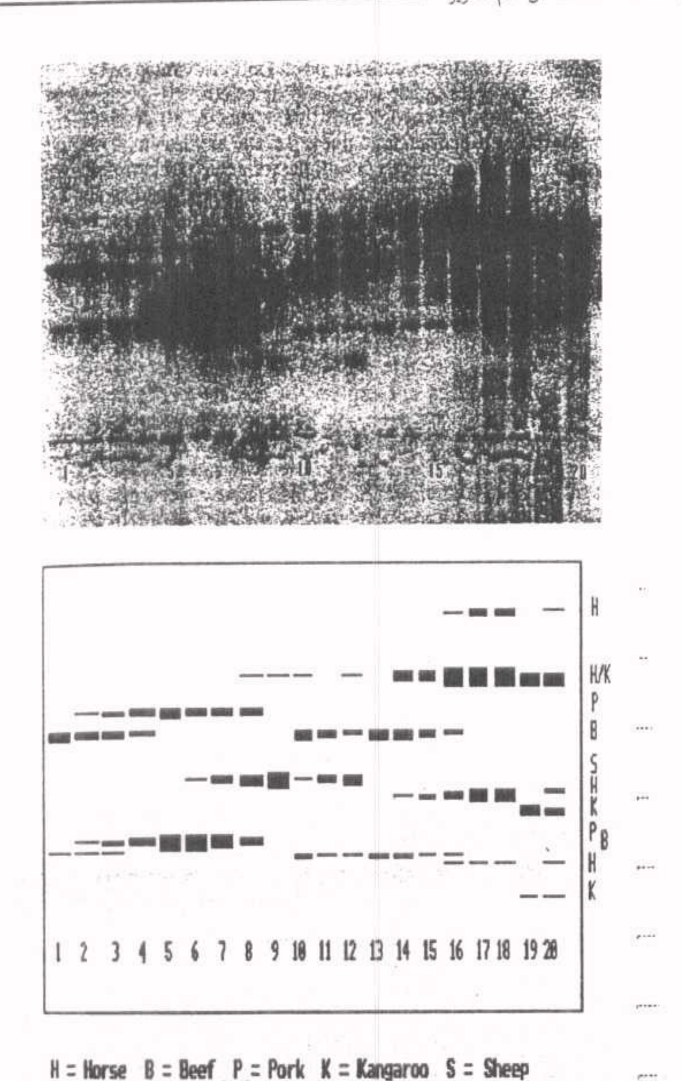


Fig. 1. 1 - (from left to right), cathode at top, anode at bottom: 1 - beef 100 %, 2 - beeflpork 90/10, 3 - beef/pork 75/25, 4 - beef/pork 50/50, 5 - pork, 6 - pork/sheep 90/10, 7 - pork/sheep 75/25, 8 - pork/sheep 50/50, 9 - sheep, 10 - beef/sheep 90/10, 11 - beef/sheep 75/25, 12 - beef/sheep 50/50, 13 - beef, 14 - beef/horse 90/10, 15 - beef/horse 75/25, 16 - beef/horse 50/50, 17 - horse, 18 - horse, 19 - kangaroo, 20 - kangaroo/horse 50/50 .

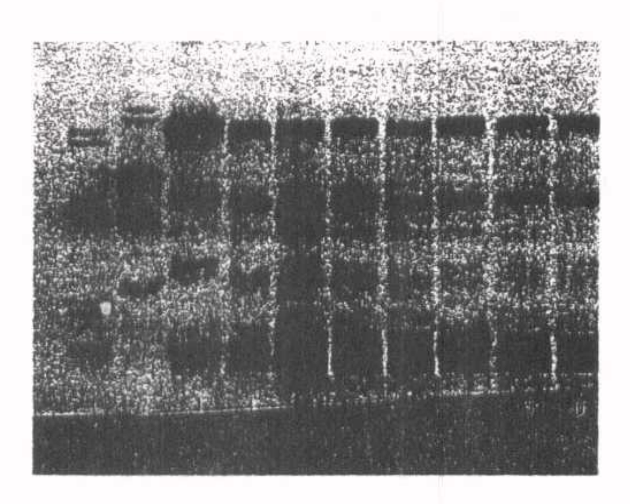


Fig. 2. 2 - (from left to right), cathode at top, anode at bottom: 1 - prok 2 - beef, 3 - horse meat (5' 100 °C), 4 - horse meat (45' 100 °C), 5 - meat croquette, 6 - meat croquette, 7 - meat croquette, 8 - horse meat (45' 100 °C), 9 - 6 + 8 (50/50), 10 - 7 + 8 (50/50) .

الكشف عن لحوم الخنزير فى منتجات اللحوم المعاملة حراريا والمعلبة باستخدام طريقة تقدير الثيامين (فيتامين ب$_1$) فيها

د. امانى الدشلوطى - كلية الزراعة - جامعة عين شمس(*)

أساس الطريقة :

تعتمد هذه الطريقة على قياس المركب الفلورسينتى للثيوكروم المتكون من العينة بواسطة فيريسينيد (ferricynide) .

الكواشف :

- محلول حمض كلوريد بوتاسيوم .
- سيانيد الحديديك (فيريسينيد) .
- محلول هيدروكسيد صوديوم (١٥ ٪) .
- محلول بوتاسيوم سيانيد الحديديك ١ ٪ .
- محلول ايزوبيوتيل الكحولى .
- محلول كحول إيثيلى .
- محلول كيتون .

الأجهزة والأدوات :

- محلول فلورميتر .
- جهاز طرد مركز .

(*) المصدر (Dash Louty 1978) .

- أنابيب جهاز طرد مركزى .
- حمامى مائى .

طريقة العمل :

- يوضع ٥ جـرام من اللحـم المفروم فى دورق مـخروطى سعـته ٢٥٠ مليلتر .
- يضاف ٥٠ مليلتر من محلول حمض كلوريد البوتاسيوم .
- يسخن المستخلص لمـدة ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة ٧٠° س فى حمام مائى مع الرج .
- يرشح المستخلص .
- يوضع ٥ مليلتر من الراشح فى أنبوبة طرد مركزى سعة ٥٠ مليلتر .
- يضاف بسرعة ٣ مليلتر من محلول هيدروكسيد صوديوم (١٥ ٪) .
- يضاف قـليل من نقط مـحلول بوتاسـيوم سياتيد الحـديديك (١ ٪) المحضر حديثا وتخلط بسرعة .
- يضاف ١٥ مليلتر من أيزو بيوثيل الكحولى بعد دقيقة من الخلط .
- تدور فى جهاز الطرد المركزى .
- تزال الطبقـة المائية ثم يصفى الايزوبيـوتيل الكحولى بإضافة ١ مـليلتر من الكحول الايثيلى .
- يقاس الفلورسنس بعد ضبط الفلوروميتر باستخدام بمحلول الكينون .
- يستخدم ٥ مليلتر من محلول الاثـيورين (الثيامين) المؤكسد كمحلول قياسى .

- مستخـلص خالى (blank) يعين بإضافة أيزوبيوتـيل الكحولى ومحلول قلوى . (مع استبعاد سياتبيد الحديديك) .

الحسابات :

محتوى الثيامين (مليجرام / ١٠٠ جرام من العينة)

$$= \frac{I}{S} \times \frac{R_x - R_{xb}}{R_s - R_{sb}}$$

R_x = قراءة الفلوروميتر للمستخلص المجهول المراد قياسه

R_{xb} = قراءة المستخلص الخالى مع المستخلص المجهول

R_s = قراءة الفلوروميتر مع محلول فيتامين ب١ القياسى

R_{sb} = قراءة المستخلص الخالى مع كلوفيتامين ب١ القياسى

S = وزن العينة بالجرام

ملحوظة : إذا زادت نسبة فيـتامين ب١ عن ٢,٦٥ مـليجرام / ١٠٠ جرام من العينة تشير إلى وجود لحم الخنزير بنسبة ٥ ٪ أو أكثر .

المراجع

المراجع العربية :

- د. أمانى الدشلوطى ١٩٧٨ الكشف عن لحوم الخنزير فى منتجات اللحوم المعاملة حراريا والمعلبة باستخدام طريقة تقدير الثيامين (فيتامين ب١) فيها كلية الزراعة - جامعة عين شمس .
- د. محمـد محمد محمـد هاشم ١٩٨٣ « الأدوية والقرآن الكريم » الدار السعودية للنشر - المملكة العربية السعودية .
- د. محمد محمد محـمد هاشم ٢٠٠٠ الأمراض التى تنتقل من الحيوان ومنتجاته إلى الإنسان ، دار المعارف - القاهرة .

المرجع الأجنبية :

- Anfimov, A. N, Lavrova, L.P. Manar berger, A.A. and Mirkin, E. U. (1959). Tach. of meat and meat production, food industry pub., Moscow.
- Bruce, W. h Pork lootest USDA prococol kit for Elisa detection of prok in cooked or canned meat products, ABC research laboratory manual Gainesville, Florida, 1989.
- Carnegie, P. R., Ilic, <.Z., Etheridge, M. O., and collins, M.G., Improved high. performance liquid chromates graphic method for analysis of histidine dipeptides anserine, carhosine and balenine present in fresh meat, J. of chromatography, 261, 1983.

- Carnegie, P.R., Collins, M.G. and Ilic, M.Z., use of histidine dipeptides to estimate the proportion of pig meat in processed meats, meat science, 10, 1984.
- Cortecs diagnostics, Biokits, in cooked meat species identificastion kit foe the qualitative detection of species content in cooked meats, meat products and animal feeds by enzyme immuno assay, U.K., 1993.
- Cortecs diagnostics, Biokits Meat species Identification for the quantitative ditection of pork content in uncooked meat and meat products by enzyme immunsassay (High sansitivity), U.K., 1994.
- Hanssen, F.W., Hagele, G.H., voorpostel, AMB, and de BAA J. A., de Baaij Myoglobin analysis for determi9nation of beef, pork, Horse, sheep, and kangoroo meat in blended cooked products, J. of food science, V. 55 No. 6, 1990.
- King, N.L. species identification of cooked meats by Enzyme - staining of Isoelricfo custing Gels, Csiro division of food research meat research laboratory, Cenron Hill, Queensland Australia, 1984.
- Nour El Din, H., Soliman, A., Ashour F., and Bayoumi, A. chenical composition of pork and matton in Egypt, food technology Dep. Faculty of Agriclture Moushtohor Zagazig university, 1984.
- Ronald G. Berger, Richard P. MAG eau, Bernard Sch wab and Ralph W. Johnston, 1987 "DEetection of Poultry and pork in

cooked and canned meat foods by Enzyme linked immunosorbent Assays" U.S. Department of Agriculture, Food saftey and Inspection Service, Microbiology Division Medical Microbiology Branch Beltsville MD 20705.

- Pavlovski, P. E, palmin, V. V., Biochemistry of meat and meat products. food inductry pub. Moscow, 1963.



الجزء الثانى

الكشف عن دهون الخنزير

فى المنتجات الغذائية



مقـــدمة

تنـص تعاليـم الدين الإسلامـى على ضـرورة خلو الأغذيـة من منتـجات الخنزير ومشتقاته كما ورد فى نص الآية الكريمة ١٧٢ ، ١٧٣ من سورة البقرة:
﴿ يَا أَيُّهَا الَّذيـــنَ آمَنُوا كُلُوا من طَيِّبَات مَا رَزَقْنَاكُمْ وَاشْكُرُوا للَّه إن كُنـــتُمْ إيَّاهُ تَعْبُدُونَ (١٧٢) إنَّمَا حَرَّمَ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةَ وَالدَّمَ وَلَحْمَ الْخنـزير وَمَا أُهلَّ به لغَيْر اللَّه فَمَنِ اضْطُرَّ غَيْرَ بَاغٍ وَلا عَادٍ فَلا إثْمَ عَلَيْه إنَّ اللَّهَ غَفُورٌ رَّحيم ﴾ .

ولقد وجد العالم كريسنسين وآخرون ١٩٦٤ Christensen et. al. أن دهن البروتوبلازم ودثورها وبخاصة التغييرات الكـيميائية فى الخلايا الحية التى تؤمن بها الطاقة الضرورية للعمليات والنـشاطات الحيوية والتى بها تمثل المواد الجديدة للتفويض عن المندثر منها) وكذلك يؤدى إلى تصلب الشرايين فى الإنسان .

وكمـا وجد العالم سـوكولوف ١٩٦٠ وآخرون Sokolov et al 1960 أن دهن الخنزيـر يؤخر خروج عصارات وإنزيمات المـعدة مما يسبب عسر هـضم عند الإنسان .

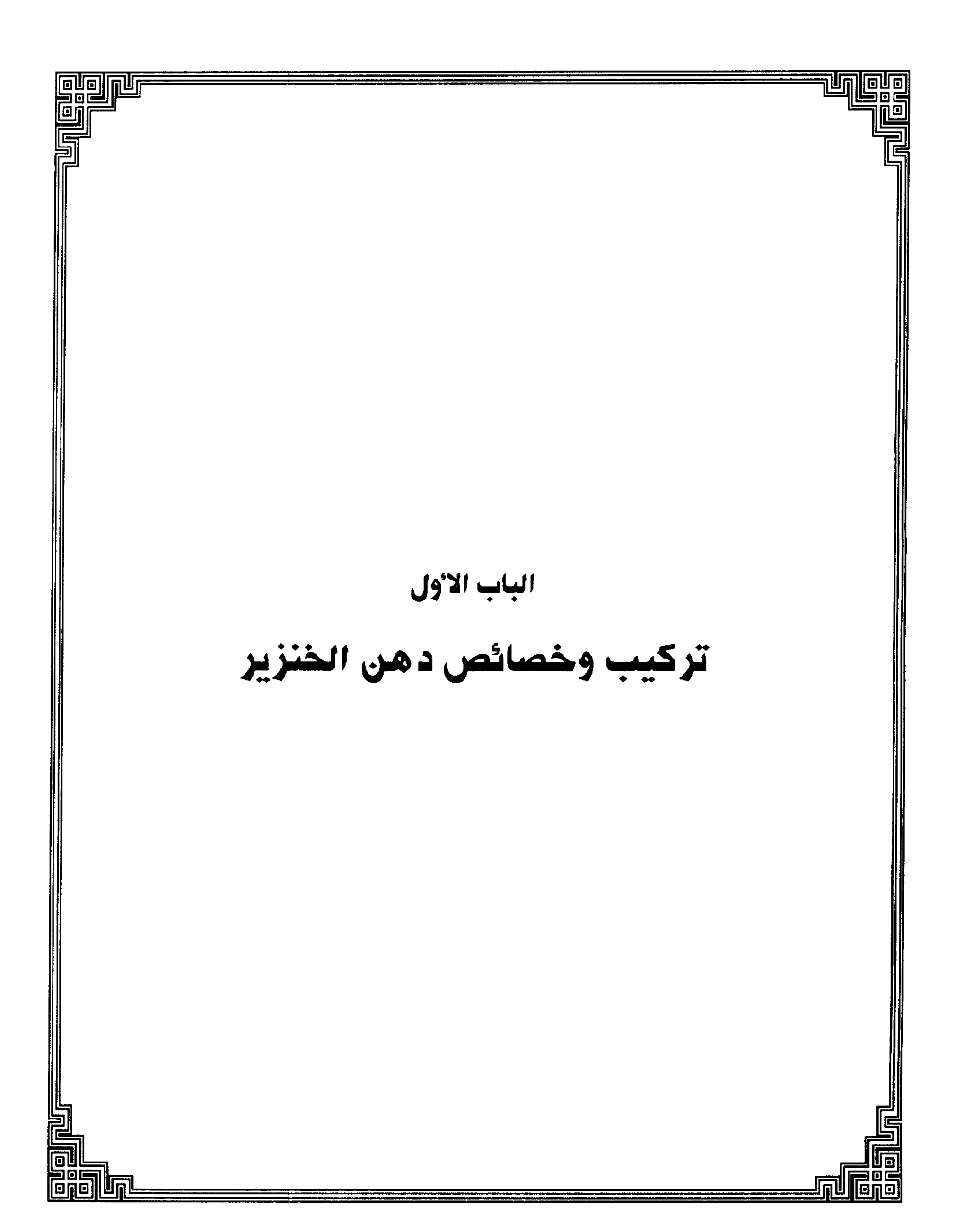
لهذا فـإنه من الأهمـية بمكان حمـاية المستـهلك المسلـم من تناول الـلحوم المصنعة المخلوطة بـدهن الخنزير . ومن هنا نجد أن الهيئات العـالمية للمواصفات والمقاييس أولــت هذا الموضوع اهتماماً كبيـراً فى ايجاد طريقة دقيقة لـلتأكد من وجود دهن الخنزير فى المنتجات الغذائية فقـامت بعمل مواصفات قياسية للحوم والدهون المستوردة لبلادنا بإيجاد طرق لتحـليل التى يمكن لمختبرات الرقابة على الأغذية فى بلادنا أن تستخدمها للكـشف عن مدى التزام المورد الأجنبى بتوريد لحوم تتفق مع مواصفاتنا الإسلامية .

ولقد سـردنا بعض الطرق والأبـحاث المختلفة لـلكشف عن دهن الخـنزير والتى نوردها كما ذكرها مؤلفوها حتى نترك الفرصة لكل مختبر باختيار الطريقة التى تناسبه تبعاً لإمكانياته .

لقد حاولنا قدر الإمـكان تبسيط العرض والإيجاز فى الكلمـة لتتناسب هذه النشرة مع الغاية المبتغاه منه فى أن يكون عملاً علمياً ميسراً لجمهور لقراء .

وبعد لا يمكن لأى إنسان أن يبلغ الكمال التام لانجاز أى عمل ولهذا برحابة صدر مـن زملائنا المخـتصين أى انـتقاد موضـوعى أو إضافـة أو تعليـق حول محتويات هذه النشرة لكى تستفيد منها فى طبعة قادمة .

المؤلف



الباب الأول

تركيب وخصائص دهن الخنزير



الباب الأول

تركيب وخصائص دهن الخنزير

دهن الخنزير هـو ذلك الدهن الذى نحصل عـليه بعملية السـلى الجاف أو الرطب لأنسـجة الخنزير . وتعتـبر طريقة السـلى الرطب أكثر شيـوعاً ، وقديماً كانت تسـتعمل طريقة السلى الجـاف عند درجة حررة ٢٣٠° - ٢٤٠° س تحت الضغط الجوى ولـكن حل محلها أخيـراً طرق السلى تحت تفريـغ دهن الخنزير الذى به نكهة خفـيفة ناتجة عن تعرض الأنسجة للحـرارة فى وجود الماء ويسمى ذلك دهن الخنزير (المندى) أو المعرض لكمية قليلة من البخار .

إن تركيب وخصائص ودرجة تماسك دهن الخنزير تختلف بدرجة كبيرة جداً تبعاً لغذاء الخنزير الذى يتناوله قبل أن يذبح ، وأيضاً حسب القطعية التى تؤخذ من الحيوان ويستخلص منها الدهن للتحليل .

وبفحص دهن الخنزير الناتج من قطعيات مختلفة من جسم الحيوان لدراسة توزيع الأحماض الدهنيـة وتركيب الجليسريدات الثلاثية بواسطـة التحليل بإنزيم الليبير وحساب تركيب الجليـسريدات الثلاثية طبقاً لنظام التوزيع ١ ، ٣ عشوائى - ٢ عشوائـى فوجد أن محتـوى الجليسريـدات الثلاثية مـن حمض البالمـتيك يتـراوح ما بـين ٢٤ - ٣٢ ٪ وبالنسبة لحـمض الأستاديك ١١ ٪ - ١٨ ٪ أما بالنسبة لحمض الأوليك فكان ٣١ - ٤٦ ٪ Chaclco, Perkins 1965 .

ونتيـجة للجهـود الكبيـرة فى دراسة تركيـب الجليسريـدات الثلاثيـة لدهن الخنزير وجد أن دهن الخنزير الأوروبى يتكون من :

٥ ٪ جليسريدات ثلاثية مشبعة .

٣٢ - ٣٩ ٪ جليسريدات ثلاثية ثنائية التشبع .

٤٠ - ٦٠ ٪ جليسريدات ثلاثية أحادية عديمة التشبع .

٣ - ١٠ ٪ جليسريدات ثلاثية غير مشبعة فى الثلاث مواضع .

(Vander 1960)

ووجد أن دهن الخنزير يحتوى بصفة أساسية على بالمتيل الجليسريدات ، وحلل دهن الخنزير بإنزيم الليبير ووجد أن ٨٣ ٪ من حمض البالمتيك فى الموضع ٢ للجليسريدات . وقد تبين أن دهن الخنزير يحتوى على حوالى ٣٠ ٪ من ٢ بالميتو ١ ,٣ ستيارين الذى يحتوى على بالميتو أولين لجلسرين ثلاثى ثنائى التشبع والذى فيه ٤٠ ٪ من ثنائى أوليو بالميتنيز . وكانت أهم الجليسريدات الثلاثية الرئيسية الموجودة فى دهن الخنزير هى :

١ و ٣ - ثنائى أوليو - ٢ بالمتين

١ و ٢ ثنائى أوليو - ٣ بالمتين

٢ بالميتو - ١ و ٣ - أوليو - ستارين

١ و ٣ - ثنائى ميريستو - ٢ لورين

Quimby etal 1953 (Luddy etal, 1968)

وعلى أية حال فقد ظهر أن دهن الخنزير له نظام توزيع متشابه للأحماض الدهنية الداخلية فى تركيب جزيئى الجليسريدات الثلاثية . حيث وجد أن معظم الحمض الدهنى البالمتيك يوجد فى الموضع رقم ٢ وقليل جداً منه يوجد فى الموضع رقم ٣ .

وبالرجوع لمواصفة لجنة دستور الأغذية نجد توضيحاً لخصائص الجودة الكيميائية والفيزيائية لدهن الخنزير المعد للطعام .

الجدول (١) يبين الخصائص الكيميائية والفيزيائية لدهن الخنزير المعد للطعام

الخاصية	المعدل المسموح به
الكثافة النسبية (عند ٤٠ ْس / عند ٢٠ ْس للماء)	,٨٩٦ - ,٩٠٤
معامل الانكسار (عند ٤٠ ْس)	١,٤٤٨ - ١,٤٦٠
درجة الإنصهار (ْس)	٣٢ - ٤٥
رقم التصبن (حجم بوأيد / حجم دهن)	١٩٢ - ٢٠٣
الرقم اليودى (ويج)	٤٥ - ٧٠
المواد غير قابلة للتصبن	أقل من ١٠ جم / كجم
اللون	أبيض
رقم الحمض	أقل من ١,٣ حجم بوأيد/ حجم دهن
رقم البيروكسيد	أقل من ١٠ مليمكافئ / كجم دهن
المواد المتطايرة (١٠٥ ْس)	أقل من ,٣ ٪
الشوائب	أقل من ,٠٥ ٪
نسبة الصابون	صفر
الحديد (ح)	أقل من ١,٥ جم / كجم
الرصاص	أقل من ,١ جم / كجم
الزرنيخ	أقل من ,١ جم / كجم

المصدر Lumley and Day, 1985

وقام العلماء Habbard and packington, 1969 بتحليل ٤٥ عينة من دهن الخنزير ، ٥٠ عينة من دهن البقر ، وذلك من ١٠ أجزء مختلفة من هذه الحيوانات وأيضاً من ١١ دولة مختلفة ، وقد أظهرت النتائج تفاوتاً كبيراً فى تركيب الأحماض الدهنية فى الجليسريدات الثلاثية والجدول التالى يوضح الاختلاف فى كل منهما :

الجدول (٢) يبين النسبة المئوية لتركيب الأحماض الدهنية فى دهن الخنزير ودهن البقر

الحمض الدهنى	دهن الخنزير	دهن البقر	دهن الخروف
المريستيك	١,٢ - ٢,١	٢,٢ - ٤,٧	٢,٣ - ٩,٧
المريستو أوليك	أثار - ٠,١	٠,١ - ٢,٠	أثار
البنتاديكا نويك	أثار - ٠,١	٠,٣ - ١,١	٠,٣ - ٠,٧
البنتاديكانويك (متفرع)	أثار	٠,٢ - ١,٠	٠,٢ - ٠,٤
البالمتيك	٢٢,٣ - ٣٢,١	٢٢,٨ - ٣٢,٢	٢٠,٣ - ٢٥,٣
البالميتو أوليك	١,٢ - ٤,٥	١,١ - ٧,٤	٠,٧ - ٢,٠
الاستياديك	١٠,٤ - ٢٢,٥	٧,٢ - ٤٢,٧	١٥,٤ - ٣٥,٢
الأوليك	٣٤,٤ - ٤٩,٢	٢٨ - ٥٤,٢	٣٢,٠ - ٤٦,٢
اللينوليك	٤,٥ - ١٥,٧	٠,٣٠ - ٢,٥	١,١ - ٥,٩
للينولينيك	٠,١ - ١٣,٨	٠,٢ - ٢,١	٢,٤ - ٤,٤
الأيكوسينويك	٠,٣ - ١,٩	أثار - ٠,١	أثار
الأيكوساديـنويك	٠,١ - ٠,٨	أثار - ٠,١	أثار

المصدر Habbard and packlington, 1969

الأحماض الدهنية مثل الديكاتويك واللوريلك والأراكدونيك ومشابهاتها المتفرعة السلسلة الموجودة فى هذه الدهون تكون بنسب صغيرة جداً بدرجة لا تؤثر على شكل الجليسريد .

الجدول (٣) يبين الخواص الطبيعية والكيمائية لدهن الغنم والخنزير تبين أن الكثافة النوعية لدهن الخنزير أعلى منها فى دهن الغنم وهذا يرجع إلى وجود نسبة عالية من الأحماض الدهنية فى دهن الخنزير وأيضاً يلاحظ ارتفاع معامل الانكسار فى دهن الخنزير عنه فى دهن الغنم وهذا يرجع إلى ارتفاع الأحماض الدهنية غير المشبعة فى دهن الخنزير (Sokolov, 1965) ووجد أن درجة إنصهار

دهن الغنـم أعلى منه فى دهـن الخنزير وهذ يرجـع إلى وجود نسبة عـالية من الأحمـاض الدهنيـة غير المـشبعـة فى دهن الخنـزير (Sokolov, 1965, El - Dashlouty, 1978, Nour El Din etal, 1984)

الجدول (٣) يبين الخواص الطبيعية والكيمائية لدهن الغنم والخنزير

الخواص	دهن الغنم	دهن الخنزير
الخواص الطبيعية :		
الثقل النوعى عند ١٥ ° س (جم / سم٣)	,٨٨٦٤	٠,٨٩٠٤
معامل الانكسار عند ٤٠ ° س	١,٤٦٢٥	١,٤٦٤٨
نقطة الإنصهار عند درجة س	٤٦	٤٠
الخواص الكيميائية :		
مدلول البيروكسيد	١,٤٨٤	٢,٦٣١
مدلول الحموضة	,٢٩٩	٠,٦٠٢
المدلول الأيودينى	٥٢,٤٠٥	٦٠,٣٧٧
رقم التصبن	٢٠٦,٦٣٥	٢٢٢,٠٦٢

المصدر : Nour El Din, 1984

الجـدول (٤) يبـين تركـيب الأحـماض الـدهـنية فـى الموقـع ٢ - ثـنائـى جلـيسريدات وثـلاثى جليـسريدات فى دهـن الغنم والخـنزير ووجد أن ثـلاثى جليسريدات تختلف فى دهن الخنزير عنـها فى دهن الغنم . ودهن الخنزير يتميز باحتوائه عـلى الأحماض الدهنية المـشبعة عنه فى دهن الحـيوانات والخضروات وخاصة حمض البالمتيك فى الموقع ، ثنائى جليسريدات (Mattson etal, 1964, Abdel Fattah, 1970, El dashlouty 1978, Mattson and Lutton, 1958 Vandar wal 1960, Coleman, 1963)

الجدول (٤) يبين تركيب الأحماض الدهنية لـ ٢ - ثنائى جليسريدات وثلاثى جليسريدات لدهون الغنم والخنزير

الأحماض الدهنية		دهن الغنم		دهن الخنزير	
		٢ - احادى جليسريدات	ثلاثى جليسريدات	٢ - احادى جليسريدات	ثلاثى جليسريدات
مريستيك	$ك_{١٤}$: ٠	٤,٤٦	٨,٢٩	٤,٨٩	١,٩٠
بنتاديكا نويك	$ك_{١٥}$: ٠	٠,٢٤	١,٢٠	--	--
بالمتيك	$ك_{١٦}$: ٠	٣,٦٦	٢٤,٤٠	٦٩,٦٩	٢٥,٥١
بالميتو أوليك	$ك_{١٦}$: ١	٣,٦٧	١٠,٩٤	٢,٦٣	٢,١٤
بيتاديكانويك	$ك_{١٧}$: ٠	٢,٨٨	٣,٠٠	--	١,٠٨
ميتاليونيك	$ك_{١٧}$: ٠	--	٣,٢٢	--	٠,٨٦
استياريك	$ك_{١٨}$: ٠	١,٠٩	١,٥٨	٥,١٤	١٣,٧١
أولييك	$ك_{١٨}$: ١	٧٥,٥٦	٤٣,٦٥	١٢,٨٣	٣٩,٨٨
لينوليك	$ك_{١٨}$: ٢	٨,٤٦	٣,٨٢	٤,٨٣	١٤,٩٦

المصدر : Nour El Din, 1984

الجدول (٥) يبين عامل الإثراء لحمض البالمتيك فى دهن الغنم والخنزير ويلاحظ أن عمل إثراء حمض البالمتيك فى دهن الخنزير أعلى منه فى دهن الغنم وهذا يرجع إلى أن حمض البالمتيك يحتوى على قليل من ٢ - ثنائى جليسريدات وزيادة فى ثلاثى جليسريدات عنه فى دهن الغنم .

(Nour Eldin etal, 1984)

الجدول (٥) يبين عامل الإثراء لحمض البالمتيك لدهن الغنم والخنزير

العينة	٪ حمض البالمتييك فى ٢ - ثنائى الجليسريدات	٪ حمض البالمتييك فى ثلاثى الجليسريدات	عامل الإثراء لحمض البالميتيك
دهن خنزير	٦٩,٦٩	٢٥,٥١	٢,٧٣
دهن غنم	٣,٦٦	٢٤,٤٠	٠,١٥

المصدر : Nour El Din, 1984

الجدول (٦) يبين النسبة غير المشبعة لدهن الغنم والخنزير

مصدر الدهن	دهن غنم	دهن خنزير
٪ الدهون غير المشبعة فى ثلاثى جليسريدات	٦١,٦٢	٥٧,٨٤
٪ الدهون غير المشبعة فى ٢ - ثنائى جليسريدات	٨٧,٦٦	٢٠,٢٩
النسبة غير المشبعة	١,٤٢	٠,٣٥

المصدر : Nour El Din, 1984

الجدول (٧) يبين النسبة الكلية لـ ك$_{١٦}$ للأحماض الدهنية / ك$_{١٨}$ الكلى للأحماض الدهنية والأحماض الدهنية المشبعة / الأحماض الدهنية غير المشبعة لدهن الغنم ودهن الخنزير فى ٢ - ثنائى الجليسريدات .

مصدر الدهن	دهن الخنزير	دهن الغنم
٪ الكلية ك١٦ فى الأحماض الدهنية	٧٢,٣٢	٧,٣٣
٪ الكلية ك١٨ فى الأحماض الدهنية	٢٢,٨٠	٨٥,١٠
٪ الكلية ك١٦ فى الأحماض الدهنية / النسبة الكلية ك١٨ فى الأحماض الدهنية	٣,١٧	٠,٠٩
٪ للأحماض الدهنية المشبعة	٧٩,٧٢	١٢,٣٢
٪ للأحماض الدهنية غير المشبعة	٢٠,٢٩	٨٧,٦٨
نسبة الأحماض الدهنية المشبعة / نسبة الأحماض الدهنية غير المشبعة	٣,٩٣	,١٤

المصدر : Nour El Din, 1984

الباب الثانى

الكشف عن دهون الخنزير

الفصل الأول : تحليل مخلوط من الدهون الحيوانية فى اللحوم المعاملة حرارياً ومشتقاتها للتأكد من خلوها من دهن الخنزير

الفصل الثانى : الكشف عن دهون الخنزير المضافة للحوم المصنعة

الفصل الثالث : كشف وتقدير دهون الخنزير فى الدهون الأخرى

الفصل الرابع : طريقة قياسية لتمييز دهون الخنزير فى الزيوت والدهون المهدرجة

الفصل الخامس : تقدير دهون الخنزير والدهون الحيوانية والنباتية فى دهن الحليب



الفصل الأول

تحليل مخلوط من الدهون الحيوانية فى اللحوم المعاملة حراريا ومشتقاتها للتأكد من خلوها من دهن الخنزير

ال - ديو جراف . ايد كارل سكنيد

إدارة الأبحاث وتحليل المكونات معامل وولف بفرنسا

L. Rugraff and Karleskind 1983 "Analysis of animal fat Mixtures cooked Meat products and devatives, are Free from port fat Department for research and Analytical formulation.

Laboratires wolff - 15, rue charless paradinas, 92116 clichy.

المصدر : Rugraf and Karlesland, 1983



الفصل الأول

تحليل مخلوط من الدهون الحيوانية فى اللحوم المعاملة حراريا ومشتقاتها للتأكد من خلوها من دهن الخنزير

أساس الطريقة :

تتميز جليسـريدات الخنزير بخاصية وجود معظم الأحماض الـدهنية المشبعة فى الموقع بيتا من الجليسريدات الثلاثية بين الأحماض الدهنية غير المشبعة تكون مرتبطة بالموقعين الفا ، وهذا عكس جميع الدهون والزيوت الطبيعية .

الفا $ك_{١}$ $يد_{٢}$ – أ – $ك^{١١}$ أ

بيتا $ك_{١}$ يد – أ – $ك^{١١}$ أ

الفا ك $يد_{٢}$ – أ – $ك^{١١}$ أ

فى هذه الطريقة يجرى فصل الجليسريدات الثلاثية المشبعة بعد التخلص من أنواع الجلـيسريدات الأخـرى بواسطة الأكـسدة ، يتبـعها فصـل الجليسـريدات الأحادية فـى الموقع بيتا بـإنزيم ليباز البـنكرياس ، يتم بـعد ذلك تقدير تـركيب الأحمـاض الدهون فـى الجلـيسريـدات الأحادية فـى الموضع بـيتـا باستـخدام الكرومـاتوجرامات الغازيـة السائلة عـلى عمود شعـرى وحساب النسبـة وبهذه المعادلة

$$ر = \frac{ك_{١٤} + ك_{١٦}}{ك_{١٨}} \times ١٠٠$$

فى حالة مخاليط من دهن البقر والخنزير

- بالنسبة لدهن البقر تقع النسبة وما بين ١٦٠٠ ، ٢٢٠٠ بمتوسط ١٨٥ (وما بين ٢٢٠ ، ٢٩٠ فى حلة عجل البقر) .

- بالنسبة لدهن الخنزير تقع نسبة (ما بين ٦٠٠ ، ٨٠٠) بمتوسط ٦٩٥ . وفى حالة وجود مخاليط من دهن البقر ودهن الخنزير فتكون قيمة (كما هو موضح فى الجدول رقم ١) .

جدول رقم (١) :

قيم نسب تكوين وتركيب الأحماض الدهنية أرقام ك١٤ ، ك١٦ ، ك١٨ فى الجليسريدات الأحادية فى الموضع بيتا الناتجة من الجليسريدات الثلاثية المشبعة فى مخاليط من دهن البقر ودهن الخنزير .

مخلوط دهن البقر ودهن الخنزير	دهن بقر ١٠٠ ٪	٩٨ ٪ دهن بقر ٢ ٪ دهن خنزير	٩٥ ٪ دهن بقر ٥ ٪ دهن خنزير	٩٠ ٪ دهن بقر ١٠ ٪ دهن خنزير
تركيب الأحماض الدهنية ونسب تكوينها				
ك١٤	١٨,٤	١٩,٦	٢١,٤	٢٣,٥
ك١٦	٤٨,٧	٥٢,٢	٥٢,٦	٥٦,٠
ك١٨	٣٢,٩	٢٨,٢	٢٦,٠	٢٠٠,٥
النسبة لـ	٢٠٣	٢٢٥	٢٨٤	٣٨٩

ملحوظة : هذه النسبة تقريبية للاسترشاد بها فقط .

- فى حالة مخاليط من دهن البقر والخنزير فى وجود دهون حيوانات أخرى.
- فى حالة وجود مخاليط من دهن البقر والخنزير مع وجود دهن الحصان فإن النسبة ر تكون كما هو موضح فى الجدول رقم (٢) .

جدول رقم (٢) :

قيم نسب تكوين وتركيب الأحماض الدهنية أرقام ك١٤ ، ك١٦ ، ك١٨ فى الجليسريدات الأحادية فى الموضع بيتا الناتجة من الجليسريدات الثلاثية المشبعة فى دهن الحصان ومخلوط من دهن البقر والحصان الخنزير .

مخلوط دهن البقر الخنزير والحصان	دهن الحصان	١٠ ٪ دهن الحصان ٩٠ ٪ دهن البقر	١٠ ٪ دهن الحصان ٥ ٪ دهن الخنزير ٨٥ ٪ دهن البقر
تركيب الأحماض الدهنية ونسب تكوينها			
ك١٤	٢٢,٠	١٩,٩	٢٠,٢
ك١٦	٦٨,١	٥٠,٩	٥٤,٠
ك١٨	٩,٩	٢٩,٢	٢٥,٨
النسبة لـ	٩١٠	٢٤٢	٢٨٨

ملحوظة : هذه النسبة تقريبية للاسترشاد بها فقط .

- فى حالة وجود مخاليط من دهن البقر والخنزير مع وجود الدجاج فإن النسبة ر تكون كما هو موضح فى الجدول رقم (٣) .

جدول رقم (٣) :

قيم نسب تكوين وتركيب الأحماض الدهنية أرقام ك١٤ ، ك١٦ ، ك١٨ فى الجليسريدات الأحادية فى الموضع بيتا الناتجة من الجليسريدات الثلاثية المشبعة فى دهن الدجاج ومخلوط من دهون البقر والدجاج ودهن الخنزير .

مخلوط دهن البقر الخنزير والدجاج	دهن الدجاج	١٠ ٪ دهن الدجاج ٩٠ ٪ دهن البقر	١٠ ٪ دهن الحصان ٥ ٪ دهن الخنزير ٨٥ ٪ دهن البقر
تركيب الأحماض الدهنية ونسب تكوينها			
ك١٤	١٣,٩	١٨,٠	١٨,٤
ك١٦	٧٤,٠	٥٠,٣	٥٣,٥
ك١٨	١٢,١	٣١,٠	٢٨,١
النسبة لـ	٧٢٨	٢٢٢	٢٥٦

ملحوظة : النسبة ر لدهن الدجاج ودهن الحصان ودهن الخنزير تعتبر قريبة جداً من بعضها . وحيث أن النسبة ر للجليسريدات الأحادية المشبعة فى الموضع بيتا فى دهن الدجــاج أو بدرجة بسيطة عن نسبتها فــى دهن الخنزير . . لذا فإن قيمة ر (سوف تســتخدم - فى هذه الحالة - بدرجة أقل تــأثيراً ، و أو انخفاض فى هذه القية يدل على وجود دهن غريب) .

الكواشف :

- دهن خنزير .
- برمنجنات البوتاسيوم .
- أسيتون نقى (درجة تحليلية) .
- حمض الكبريتيك ٥٠ ٪ .
- فوق أكسيد الهيدروجين ١٣٠ جم .

- ماء مقطر .
- ثنائى إثيل إيثير .
- كبريتات الصوديوم .
- مذيب يتكون من ٨٣ هكسان ، ١٧ إيثير .
- محلول منـظم أو مول تريس - هيدروكسى ميـثيل أمينوميثان يـضبط حتى رقم هيدروجين = ٨ بإضافة حمض هيدروكلوريك ٤ ع .
- محلول كلوريد صوديوم ١ , ٠ ٪ .
- محلول كلوريد كالسيوم ٢٢٠ حجم/لتر .
- هكسان .
- إنزيم ليباز البنكرياس .
- حمض هيدروكلوريك ٤ ع .
- مذيب مكون من الكلوروفورم والأسيتون بنسبة ٩٦ : ٤ على الترتيب .
- صبغة الرودامين چى الحمراء .
- ثالث فلوريد البورون .
- ميثانول .
- هيدروكسى صوديوم .
- الغازات المستخدمة فى الفصل الكروماتوجرافى : الهليوم ٦ , ٠ بار (ضغط جـوى) ، الهيـدروجين ٢٥ مل/ق ، أو مخـلوط صنـاعى معـدله ٣٠٠ مل/ق .
- البيتا أحادى الجليسريدات الناتجة من الجليسريدات الثلاثية المشبعة .
- سليكا مبعثرة فى الهكسان .

الأجهزة والأدوات :

- عمود فصل كروماتوجرافى طوله ٤٥ سم ، وقطره الداخلى ٢,٥ سم ، مغلق بصنبور معبأ بـ ٣٠ جم حتى ارتفاع أكثر من ١٥ سم سليكا جيل مبعثره فى الهكسان يستخدم فى تنقية الجليسريدت الثلاثية .
- ألواح سليكا جيل تستخدم فى الفصل بكروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة .
- شروط الكروماتوجرافيا المستخدم (على سبيل المثل) :
- كروماتوجرف طراز فاريان ٤٦٠٠ مجهز بحاقن شعرى مقسم حتى ١ ٪.
- راسم حسابى طراز فاريان ٤٠١ .
- عمود كروماتوجراف زجاجى شعرى طراز س بى واكس كروم باكت ، قطره الداخلى ٠,٣٢ مم ، وطول ٢٥ متر ، سمك الفيلم أو الجدار الخارجى ٠,٢ ميكرون .
- درجة الحرارة : ٢٧٠° س للحاقن ، ٢٦٠° س للكاشف برنامج عمل الجهاز : ترفع درجة حرارته إلى ١٤٠° س لمدة ١٠ ق ، ثم من ١٤٠° س إلى ١٨٠° س بمعدل ١,٥° س / دقيقة ، ثم تضبط درجة الحررة عند ١٨٠° س لمدة ٢٥ دقيقة .
- حجم الجزء المحقون = ١ ميكروليتر .
- الغاز المستخدم : هليوم ٠,٦ بار (ضغط جوى) هيدروجين ٢٥ مل/ق ، أو مخلوط صناعى معدل تدفقه ٣٠٠ مل/ق .

طريقة العمل :

الحصول على الجليسريدات الثلاثية المشبعة :

- يوزن ٢ مم من الدهن فى دورق زجاجى مستدير سعته ٥٠٠ مل .
- يضف ١٨ مم برمنجنات بوتاسيوم ثم ٢٠٠ مل أسيتون .
- يجرى الغليان لمدة ثلاث ساعات .
- يبرد الدورق ثم يبخر مباشرة كل الأسيتون فى جهاز تبخير عاكس .
- يضاف ٧٥ مل حمض كبريتيك ٥٠ ٪ .
- يزال اللـون باستعمال ٢٠ مل تقريباً من فوق أكسـيد الهيدروجين ١٣٠ مم (تجرى هذه الخطوة تحت خزانة أو حيز تهوية) .
- يضاف ١٠٠ مل ماء مقطر مبرد مباشرة .
- يجرى الاستخلاص بـ ٧٥ مل ثنائى إيثيل إيثير فتتكون طبقتين .
- تجمع الطبقة الإيثيرية كلها وتغسل بـ ٥٠ مل ماء .
- ترشح الطبقة الإيثيرية فوق كبريتات الصوديوم .
- يبخر ثنائى إيثيل إيثير حتى يصبح المتبقى بضعة مليمترات .
- تنقية الجليسريدات الثلاثية :
  - يجهز عمود فصل كروماتوجرافى طوله ٤٥ سم . وقطره الداخلى ٢,٥ سم ، مـغلق بصـنبور ومملـوء بـ ٣٠ مم سليكـا مبعثـرة فى الهكـسان وارتفاعها فى العمود ١٥ سم فأكثر .
  - يجرى تفريغ المحلول الإيثرى للجليسريدات المؤكسدة فوق قمة العمود .

- تفصل الجليسريدات المشبعة بـ ٢٠٠ مل من المذيب (٨٣ هكسان + ١٧ إيثير) .
- يجرى التقطير ثم يبخر المذيب .
- يقدر تركيب الأحماض الدهنية فى الجليسريدات الثلاثية المتحصل عليها عن طريق إجراء الفصل بالكروماتوجرافيا الغازية السائلة للأحماض الدهنية للتأكد من عدم وجود الأحماض الدهنية غير المشبعة .

- المعاملة الإنزيمية :
- يحضر ما يلى :
- عدد واحد محلول منظم أو مول تريس - هيدروكسى ميثيل أمينو ميثان رقمه الهيدروجينى ٨ .
- عدد واحد محلول كلورات صوديوم ١,٠ ٪ .
- عدد واحد محلول كلوريد كالسيوم ٢٠٠ جم/لتر .

- يوضع ما يلى فى أنبوبة يمكن أغلاقها بإحكام :
  ٣٥ جم جليسريدات مشبعة ، ٣ مل هكسان ٢ مل محلول منظم (تريس) ، ٦,٠ مل كلورت صوديوم ، ٥,٠ مل كلوريد كالسيوم .

- يجرى الرج حتى يذوب الدهن يضاف ٤ كرات زجاجية ثم يضاف ٨ مجم أنزيم ليباز . توضع المواد السابقة فى حمام مائى عند درجة حرارة ٤٠ س ثم يجرى الرج لمدة ٤ ق ثم لمدة ٢ ق عند درجة الحرارة العادية .

- يوقف النشاط الإنزيمى بإضافة حمض هيدروكلوريك ٤ ع ثم تفصل طبقة الهكسان .

- فصل البيتا أحادى الجليسريدات على لوح كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة :

- توضع العيــنة المراد تحليلها فوق ألواح الــسليكا جيل التى جــرى غسلها بثنائى إيثيل إسترات .
- تجرى الإزاحة بمخلوط مكون من الكــلوفورم والأسيتون بنسبة ٩٦ : ٤ على الترتيب .
- يرش اللوح بالرودأمين جى .
- يجرى تحديد الجليسريدات الأحادية تحت الأشعة فوق الحمراء .

- تحليل الأسترات وإجراء التحليل بالكروماتوجرافيا الغازات السائلة .

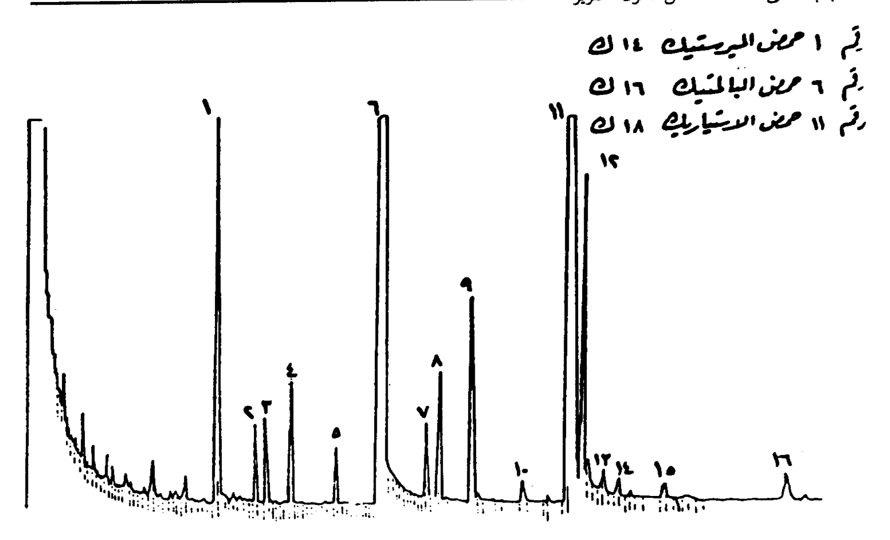
- يكــشط شــريط الجـلـيـسريــدات الأحاديــة ، وتحول الأحــماض الـدهنـية للجليسريدات الأحادية إلى أسترات الميثيل بطريقة ثالث فلوريد البورون كما يلى :

يســتعمل ٢٠ مل ميثانول ، يــضاف إليه ٤ مل هيدروكسيــد صوديوم ، ثم يجرى الــغليــان لمدة ١٠ دقائــق ، يضف ثــالث فلوريــد البورون ويــجرى الغليان لمدة دقيقتين ، يضاف ماء مشــبع فى كلوريد الصوديوم وترفع طبقة الهكسان وتحقق فى جهاز الكروماتوجرفيا المجهز بعمود شعرى .

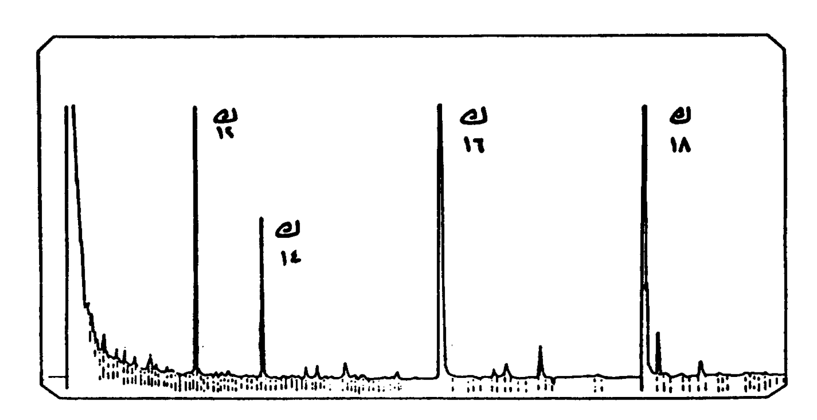
- شــروط الكــروماتــوجراف لمــستــخــدم وحجــم لجزء لمحــقون (أنــظر فــى الكواشف) .

- التعبير عن النتائج :

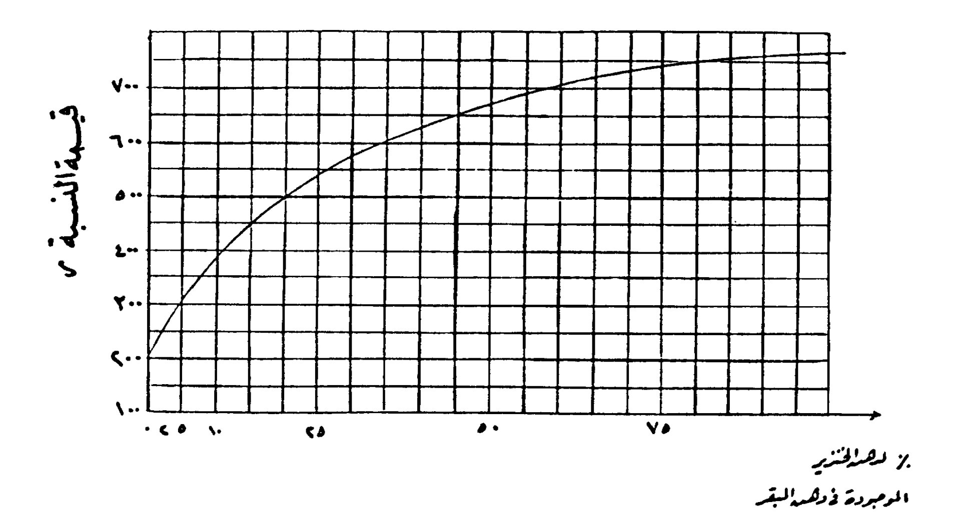
الشكل رقم (١) نموذج يوضح التحليل الــكروماتوجرافى لدهن البقر على عمود كروماتوجرافى زجاجى شعرى بعد أكــسدتها بالبرمنجنات . والشكل رقم (٢) يوضح تركيب الأحماض الدهنية لبــيتا أحادى جليسريدات النتجة من الجــليسريدات المشبعة ، والشكل (٣) يوضح العلاقة بين النسبة ر و ٪ لدهن الخنزير الموجودة فى دهن البقر .



شكل (١) التحليل الكروماتوجرافى لدهن البقر بعد أكسدته بالبرمنجنات



شكل (٢) تركيب الأحماض الدهنية فى البيتا أحادى الجليسريدات الناتجة من الجليسريدات المشبعة



شكل (٣) العلاقة بين النسبة ر والنسبة المئوية لدهن الخنزير الموجودة فى دهن البقر



الفصل الثانى

الكشف عن دهون الخنزير المضافة للحوم المصنعة

سعاد الحوطى . يان تنسلى . إبراهيم حمدان
معهد الكويت للأبحاث العلمية ١٩٨٣

ورقة مقدمة فى المؤتمر العربى الأول للمواصفات والمقاييس فى الصناعات الغذائية .



الفصل الثانى

الكشف عن دهون الخنزير المضافة للحوم المصنعة

أساس الطريقة :

تعتمد طرق البحث المستخدمة على الأساس العلمى لتركيب الشحوم الحيوانية . فمن المعروف أن الشحوم عادة تحتوى على العديد من الجليسريدات الثلاثية المحتوية على الأحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة . وتكون معظم الأحماض الدهنية المشبعة مرتبطة بذرتى الكربون الأولى والثالثة بينما معظم الأحماض الدهنية غير المشبعة ترتبط بذرة الكربون الثانية . وعلى عكس ذلك ينفرد شحم الخنزير بصفة وجود نسبة كبيرة (٨٠ ٪) من الحامض الدهنى المشبع (حامض البالمتيك) مرتبط بذرة الكربون الثانية ، فى حين أن النسبة لا تزيد عن ٣٠ ٪ فى شحوم الحيوانات الأخرى .

وبذلك لو أمكن تتبع نسبة حامض البالمتيك المحملة على ذرة الكربون الثانية للجليسريدات الثلاثية فى اللحوم المصنعة فإنه يمكن الكشف على مدى وجود لحم الخنزير .

ومن جهة أخرى فقد وجد أنه تبعاً لتوزيع الأحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة على ذرات الكربون الثلاثة لكل من الجليسريدات الثلاثية تتواجد ٦ فصائل مختلفة من الجليسريدات . فمثلاً تود الجليسريدات ذات الأحماض المشبعة تماماً وذات الأحماض غير المشبعة تماماً وأخرى يتراوح فيها عدد وحدات الأحماض غير المشبعة بنسب مختلفة وفى أوضاع مختلفة . كما هو مبين فى جدول رقم (١) .

ففى هذه الحالة فإن النسب لكل من (م س م) ، (س م م) ، (س م س)

من الجليسريدات الثلاثية للشحوم المختلفة توضح الصفات التى ينفرد بها شحم الخنزير .

جدول رقم (١)

توزيع فصائل الجليسريدات الثلاثية فى الشحوم الحيوانية

نوع الشحم الحيوانى	م م م	م س م	س م م	س م س	م س س	س س س
الخنزير	٥	١	٣٨	٤١	٧	١١
البقر	١٤	٢٧	١٤	٤	٣١	٨
الغنم	١٨	٣٨	١٢	٠,٢	٢٦	٥
الأرنب	٦	٣٣	٨	٢	٣٩	١٢
الدجاج	٣	١٣	٩	٧	٣٩	٣٠

م = أحماض دهنية مشبعة .

س = أمراض دهنية غير مشبعة .

طرق البحث :

١- تحضير العينات :

تم تحضير عينات من لحم البقر ولحم الغنم كل على حدة مضاف إليها لحم خنزير بنسبة صفر ، ١ ، ٢ ، ٥ ، ١٠ ٪ . ثم قسمت إلى مجموعتين الأولى تم تجميدها مباشرة بعد الخلط والثانية تم تعليبها ومعاملتها حرارياً كما هو متبع فى طرق تصنيع اللحوم المعلبة .

ب - تقدير توزيع الأحماض الدهنية باستخدام إنزيم الليبيز :

تم فصل الجليسريدات الثلاثية بحالة نقية من العينات المحضرة على مرحلتين ، الأولى باستخدام الكلوروفورم ، ميثانول (١ : ١ بالحجم) والثانية باستخدام ميثانول ، هكسان (٢ : ٧ بالحجم) . ثم تقدير كمية ونوعية الأحماض الدهنية الكلية فى الجليسريدات الثلاية المفصولة باستخدام جهاز الكروماتوجرافى (غاز - سائل) بعد تحضيرها على صورة استرات المثيل للأحماض الدهنية .

ولتقدير الأحماض الدهنية المرتبطة بذرة الكربون الثانية ، ثم الآتى : أولاً: معاملة الجليسريدات الثلاثية بإنزيم الليبيز البنكرياس تحت درجة حرارة ٣٧ْ م ، وتحت درجة الأس السالب الأيدروجينى ٨,٠١ ولمدة خمس دقائق وذلك لتكسير الرابطة الكيميائية بين الأحماض الدهنية المرتبطة بذرتى الكربون الأولى والثانية من جزئ الجلسرول . وبذلك تتبقى الأحماض الدهنية المرتبطة بذرة الكربون الثانية التى يتم فصلها عن باقى المكونات باستخدام رقائق السليكا جيل. ثانياً : تقدير كمية ونوعية الأحماض الدهنية المرتبطة بذرة الكربون الثانية باستخدام جهاز الكروماتوجرافى (غاز - سائل) بعد تحضيرها على صورة استرات المثيل للأحماض الدهنية .

جـ - طريقة تقدير توزيع الجليسريدات الثلاثية باستخدام جهاز الكروماتوجرافى السائل تحت ضغط عالى :

تم فصل الجليسريدات الثلاثية بحالة نقية على مرحلتين كما ورد فى الطريقة السابقة . ثم معاملته بغاز الأوزون لمدة دقيقتين . بعد ذلك تم اختزال المركب الناتج بغاز الأيدروجين لمدة ٣٠ دقيقة لتحويل المركب إلى الدهن ثم تقدير توزيع الجليسريدات الثلاثية فى المخلوط الألدهيدى باستخدام جهاز

الكروماتوجـرافى السائل تحت ضغط عالـى بعد تحضيرها على صـورة مشتقات يمكن الكشف عنها باستخدام الأشعة فوق البنفسجية فى جهاز الكشف .

نتائج البحث :

باستخدام طريقة توزيع الأحماض الدهنـية (طريقة إنزيم الليبيز) تم حساب نسبتين ، الأولى : نسبة حمض البالمتيك (ك$_{١٦}$) إلى حامض الستياريك (ك$_{١٨}$) المرتبطتين بذرة الكربون الثانية .

ثانياً : نسبة حـامض البالمتيك (ك$_{١٦}$) إلى حامض الأولـييك (ك$_{١٨}$: ١) المرتبطـة بنفس ذرة الكربـون وعلاقة هذه النسب المحـسوبة وكمية لحـم الخنزير المضـاف فى لحم البقر ولحم الغـنم كما هو مبين بـشكل رقم ١ (أ ، ب) على التوالى .

يبين الشـكل أن هناك علاقة طردية بـين هذه النسب المحسوبة وكـمية لحم الخنزيـر المضافة وتـبدأ هذه النـسبة فى الـزيادة ابتداء مـن إضافة ١ ٪ من لحـم الخنزير . إلا أن هذه العلاقة تكون أكثر وضـوحاً فى حالة استخدام نسبة (ك$_{١٦}$ / ك$_{١٨}$) عنها فى (ك$_{١٦}$ / ك$_{١٨}$: ١) فى كل من لحم البقر والغنم ، كذلك فى اللحم المجمد والـلحم المعامل حرارياً ، بمعنى أن معاملة الـلحم حرارياً لا تؤثر على نسب توزيع الأحماض الدهنية فى الجليسريدات الثلاثية وتعتبر هذه النتائج مبدئيـة ويجب قبل التوصيـة بتطبيق هذه الـطريقة أن تجرى على عدد كـبير من العينات وتحلـيل النتائج احصائياً لمعـرفة حدود الثقة عند استخـدام هذه الطريقة للحكم على وجود لحم الخنزير .

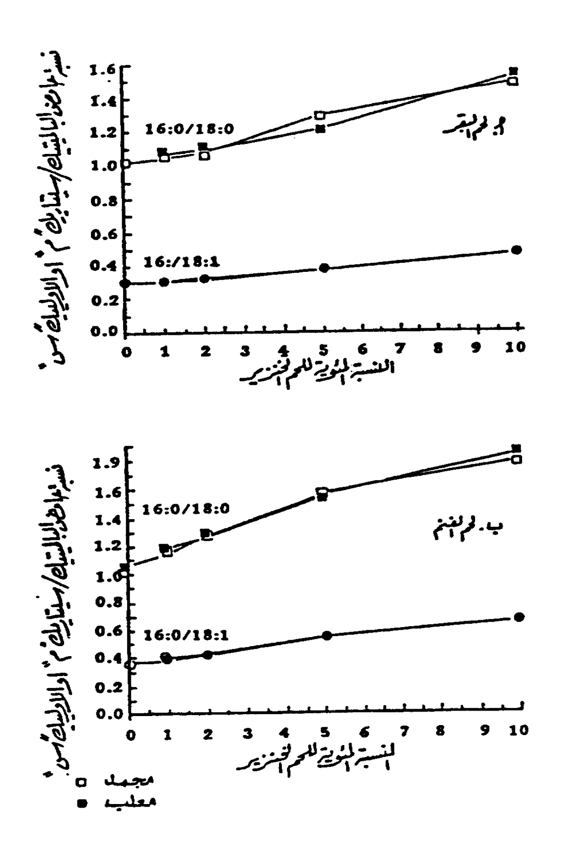
بالنـسبة للتـعرف على وجود لحم الخـنزير عن طريـق توزيع الجليـسريدات الثلاثية باستخدام جهاز الكروماتـوجرافى السائل تحت ضغط عالى ، ثم حساب نسبة م م س / م س م فى عينات لحم البقر والغنم وعلاقة هذه النسب بكميات

لحم الخنزير المضافة إلى كل منها (شكل رقم ٢) ويوضح هذا الشكل وجود علاقة طردية بين هذه النسبة للجليسريدات الثلاثية ونسبة لحم الخنزير المضافة . وبوجود هذه العلاقة يمكن الحكم بوجود لحم أو شحم الخنزير أو عدم وجوده. وقد أثبتت التحليلات التى أجريت على العديد من العينات التجارب المعروفة مسبقاً والتى به نسبة من لحم الخنزير مدى صدق هذا الاتجاه .

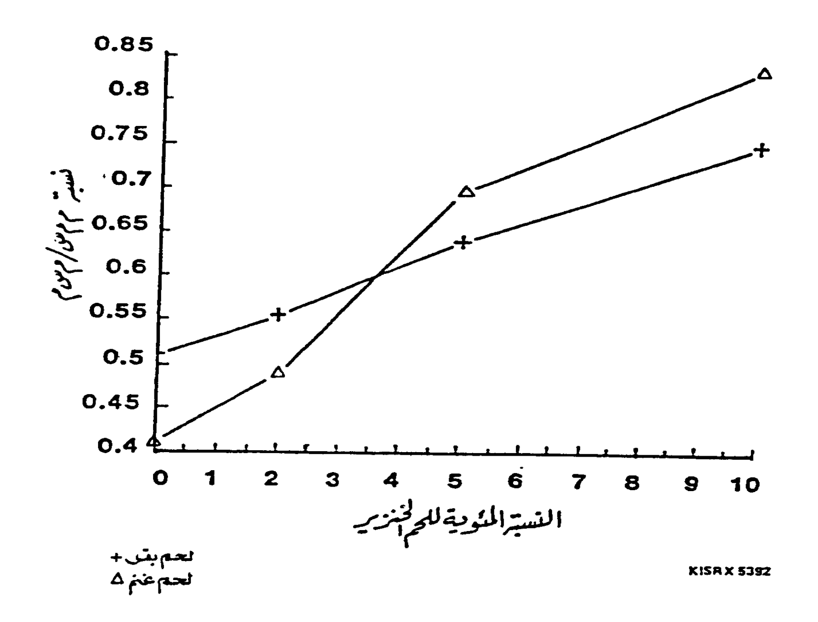
الخاتمة :

بناء على ما أظهرته النتائج فإنه يمكن اعتبار الطرق التى اتبعت فى هذه الورقة أساساً صالحاً للحكم على وجود شحم ولحم الخنزير فى اللحوم المصنعة.

ومازالت الدراسة مستمرة فى مرحلتها الثانية آخذين فى الاعتبار ضرورة إجراء التحليل على العديد من العينات تحت ظروف مختلفة لتحديد مدى دقة الاعتماد على كل منها وامكانية تبسيط طرق التحليل حتى يمكن بعد ذلك التوصية بتعميم استخدامها فى معامل الرقابة على الأغذية التى تتولى مسئولية حماية المستهلك .



شكل رقم (١) : تغييرات نسب الأحماض الدهنية فى لحم البقر والغنم المرتبطة بذرة الكربون الثانية ومدى تأثرها بإضافات لحم الخنزير .



شكل رقم (٢) : تغييرات نسب الجليسريدات الثلاثية (م م س/ م س م) فى لحوم البقر والغنم ومدى تأثرها بإضافات لحم الخنزير .

الفصل الثالث

كشف وتقدير دهون الخنزير فى الدهون الأخرى

ج ايه . داى . اى دى لملمى

قسم السلع الغذائية - المعمل الحكومى الكيميائى

كورنيل هاوس - لندن (١٩٨٥)

J. A. Day and I. D. Lumley, 1985

"Detection and Determination of Park Fats in other fats"

Food Commobitlies section, The laboratory of the Governemnt Chemist. cornwall House, Walerloo Road, London SE 8XY



الفصل الثالث

كشف وتقدير دهون الخنزير فى الدهون الأخرى

يمكن استخدام الطرق المعتمدة على تحليل الأحماض الدهنية والأستيرولات فى تقدير نسبة دهن الخنزير فى الزيوت النباتية كما يمكن استخدامها تحت ظروف معينة فى معرفة هل يوجد دهن بقر مع دهن الخنزير أم لا إلا أن وجود دهن الخنزير مختلطاً مع ذهون حيوانية أخرى لا يمكن تقديره إلا إذا كان دهن الخنزير يوجد بتركيز مرتفع كما أنه لا يمكن الاعتماد فى الكشف عنه على طريقة تعيين صور مشابهات لأحماض الدهنية الكلية لأن شكل أو صورة الحمض الدهنى فى دهن الخنزير تشابه بدرجة كبيرة جداً صورته فى دهن البقر وأيضاً فى الدهون الحيوانية الأخرى ، وبالتالى فلا يمكن أن تستخدم فى تقدير نسبة دهن الخنزير كما فى منتجات اللحوم . كما أن الطرق الأخرى المستخدمة فى التحليل مثل الطرق الضوئية (الاسبكتر وفوتومترية) مثل الأشعة تحت الحمراء وفوق البنفسجية أيضاً أرقام يومر وأرقام التستر ، لا تعطى مؤشرات دقيقة للكشف غير دهن الخنزير فى الدهون الحيوانية الأخرى بالتالى لا يمكن استخدامها فى تقدير دهن الخنزير .

لذا فقد تم التركيز على المعلومات المتعلقة بوجود حمض البالميك بدرجة كبيرة فى الموضع رقم ٢ (بيتا) للجليسريدات الثلاثية لدهن الخنزير ، والطريقة الواردة فى هذا التقرير تعتمد على تحليل الأحماض الدهنية فى الجليسريدات الثلاثية الكلية فى الموضع رقم ٢ وهى تعطى أفضل نتائج وصفية أو كمية لتقدير دهن الخنزير .

تقدير الأحماض الدهنية فى الموضع رقم ٢ (بيتا) فى الجليسريدات الثلاثية للدهون

أساس الطريقة :

- إجراء التحلـيل الجزئى للجليـسريدات الثلاثية المتـحصل عليها من الـعينات بستخدام إنزيم ليباز البنكرياس وذلك قبل بدء التقدير .
- إجراء الفصل للجليسريـدات الأحادية فى الوضع (٢) المكونـة من التحلل الجزئى للجليسريدات الثلاثية - وذلك عن الجليسريدات الثنائية والأحماض الدهنية الحرة والجليسريدات الثلاثية بواسـطة كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة وتقديرها كمياً على اللوح الكروماتوجراف .
- إجراء الـتصبن للجلـيسريدات الأحادية فـى الوضع (٢) ثم المثيلة وتـقدير صور مشابهـات الأحماض الدهنية بواسطة الـكرماتوجرافيا الغازيـة السائلة على عمود .

الكواشف :

- مذيب العمود المستخدم فى كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة :
  الهكسان العادى : ٧٠
  ثانى إيثيل إثير : ٣٠
  حمض الفورميك : ١
- هيدروكسيد البوتاسيوم ، محلل الميثانوليك ١٢٠ مم/ لتر .
- محلول حمض الهيدروكلوريك ٦ مول .
- محلول كلوريد الكالسيوم ٢٢٠ جم/ لتر .

- محلول كولات الصوديوم (درجة جودة إنزيمية) ١ جم/لتر .
- محلول منظم : ١ موول تريس - هيدروكسى ميثيل أمينوميثان المائى يضبط على رقم أس هيدروجينى يساوى ٨ بإضافة حمض هيدروكلوريك ٦ ع .
- محلول ٢ ، ٧ ثنائى كلوروفلور ستين ، يحضر بإذابة ٢ مم منه فى ١ لتر محلول الإيثانول ٩٥ ٪ ويضاف نقطة واحدة من محلول هيدروكسيد الصوديوم ١ ع كل ١٠٠ مل من هذا المحلول ليصبح قلوياً بدرجة خفيفة .
- محلول ثالث فلوريد البورون مذاب فى ١٤ ٪ ميثانول .

طريقة العمل :

- التحليل باستخدم إنزيم ليباز البنكرياس . يوزن فى أنبوبة اختبار مدرجة ١,٠ مم عينة دهن الخنزير ويجرى إذابتها فى ٢,٠ مل هكسان (فى حالة الضرورة تدفأ بلطف) يضاف ٢٠ مم من محلول إنزيم الليباز ، ٢ مل محلول منظم وتهز جيداً ثم يضاف ٥, مل من محلول كولات الصوديوم، ٢,٠ مل من محلول كلوريد الكالسيوم تغلق الأنبوبة بإحكام بواسطة سداده زجاجية محكمة القفل ، وتخلط المكونات جيداً . مع ملاحظة عدم ملامسته للسدادة فى الأنبوبة ، توضع الأنبوبة فى حمام مائى مضبوط بترموستات عند درجة حرارة ٤٠° س تهز الأنبوبة لمدة ١ دقيقة فقط . ترفع الأنبوبة من الحمام المائى وترج بشدة فى خلاط (وايرلى مكس) لمدة دقيقتين وتبرد الأنبوبة فى الحال تحت ماء جارى ، يضاف ١ مل محلول حمض الهيدروكلوريك و ١ مل ثنائى إيثيل إيثير ، تسد الأنبوبة وترج بشدة، ويترك المخلوط ليستقر وترفع الطبقة العضوية بماصة بماستير ويجرى الطرد المركزى إذا لزم الأمر .

- فصل الـ ٢ أحادى جليسريدات :

بواسطة أنـبوبة شعرية زجاجـية يوضع مستخلـص ثنائى الإيثيل إيـثير فوق لوح كروماتوجرافـيا الطبقة الرقيقة عـلى شكل خط رفيع منتظـم على بعد ١٥ مم من حافـة القاع يمكن اسـتخدام ألواح كرومـاتوجرافية ذات طـبقة سيللوزية سابقـة التركيز . يجرى الفصل على اللوح الـكروماتوجرافى فى وعاء مشبع جيداً بالمذيب المستخدم . بـحيث يكون المذيب على بعد حوالى ١٠ مم مـن قمـة حافـة الـلوح الـكرومـاتـوجرافـى . يـجفـف اللـوح الكرومـاتوجرافى فى حيز هواء ساخن ثم يرش عـليه محلول ٢ ، ٧ ثنائى كلوروفلورسـين . يجرى تمييز شريط الجلـيسريد الأحادى (ال RF حوالى ٠,٣) تحت لمبة من الأشعة فوق البنفسجـية وتحدد هذه الطبقة أو المنطقة ترفع كل طـبقة الجليسريد الأحـادى بمعلقة صغيرة جـداً وتوضع فى دورق تصبن .

- التصبن والميثله :

يضاف ٥ مل من مـحلول ٠,٥ مول هيدروكس الـبوتاسيـوم ميثانـوليك (هيدروكسيد بوتـاسيوم مذاب مع كحول الميثانول) ثم يـجرى التصبن تحت مكثف عاكس لمدة ١٠ ق . يضاف ٥ مل من محلول ثالث فلوريد البورون ١٤ ٪ المذاب فـى الميثـانول ثم يـجرى التصـبن لمدة ٥ دقائق أخـرى تحت مكثف عاكس . يضاف ٥ مل من مخـلوط الأيزواكتان ، يجرى الخلط ثم التبريد بعد ذلك ، يضاف ٥ مل من مـخلوط الأيزواكتان يجرى الخلط ثم التبريد بـعد ذلك ، ويضاف ماء غير مـؤين حتى يطفو الأيزواكـتان ويصل إلى عنق الـدورق . يؤخذ الأيزواكتان بواسـطة ماصة باستيـر ويوضع فى أنبوبة صغيرة تحتوى على كبريتات صوديوم لامائية .

- إجراء التصبن والمثيله للجليسريدات الثلاثية :

يوزن ١,٠ مم من الـدهن الذى تم استـخلاصه من الـعينة المـوجودة فى دورق التصبن وتجرى الخطوات السابق ذكرها .

- التحليل الكروماتوجرفى الغازى :

وصف الجهـاز : جهاز فصل كرومـاتوجرافى ماركة كـارلواير - ٤١٦٠ ، مثبت به عمود فصل زجاجى شعرى طوله ٥٠ متر × ٢٣,٠ مم طراز دبليو ، س ، او ، تى ديوبلكس ٤٠٠ .

درجة حرارة الفرن ١٧٠ ° س، درجة حرارة الحاقن والكشف ٢٥٠ ° س ، الكشف لـهب محدف للتأين . الغاز الحامل : هلـيوم يندفع بمعدل ١ مل لكل دقيقة الفصل (٨٠ : ١) .

النتائج والمناقشة :

لكى نبحث عن طريـقة يمكن الاعتماد عليها للكشـف عن دهن الخنزير فى مخلوط من الدهون الحـيوانية الأخرى عن طريق التعرف علـى الحمض الدهنى فى الوضع ٢ من الجليسريد الأحادى (النتائج من الدهن) . يجرى تقدير صورة المشابهة للحمـض الدهنى فى الجليسريدات الثلاثية والجـليسريدات الأحادية فى الموضع ٢ (٢ أحادى جليسريد) المحضرة من الدهون التالية :

(أ) دهن الخنزير : الموجود تحت الجلد ، وفى العضلات .

(ب) دهن البقر : الموجود حت لجلد ، وفى العضلات .

(جـ) دهن الخروف الصغير (الحمل) الموجود فى العضلات .

أمثلة لأشكال مشابهات الأحماض الدهنـية فى الجليسريدات الثلاثية والـ ٢ أحادى جليسريدات المحضرة موضحة فى الملحق .

الجـدول رقم ٣ يبين النـسبة المـئوية بالمـول للأحماض الـدهنيـة الرئيسـية الموجودة فى عينة دهن الخنزير (متوسط نـتائج) وقد كانت النقاط الرئيسية ذات الأهمية فيه هى :

١ - نسبة حمض البالمتيك (ك١٦ : صفر) فى الأحماض الدهنـية الناتجة من الـ ٢ جليسريدات حوالى ٣ أضعاف مثيلتها فى الجليسريدات الثلاثية الكلية .

٢ - نسبة حمض الأستايريك (ك١٨ : صفر) وحمض الأوليك (ك١٨ : ١) فى الأحماض الدهنـية الناتجة من الجليسريدات الثـلاثية تمثل حوالى ٤ أضعاف مثيلتها فى الأحماض الدهنية الناتجة من ال ٢ أحادى جليسريدات .

والجدول رقم ٤ يـبين النسـبة المئويـة بالمول للأحـماض الدهنـية الرئيـسية الموجودة فـى عينة دهــن البقر (مـتوسط نتائـج) وكانت النـقاط الرئيـسية ذات الأهمية فيه وهى :

١ - نسبة حمض البالمتيك (ك١٦ : صفر) فى الجليسريدات الـثلاثية كانت أكبر من نسبة الـ ٢ ثنائى جليسريدات على عكس دهن الخنزير .

٢ - نسبة من حـمض الأوليك (ك١٨ : ١) فى الـ ٢ ثنائى جلـيسريدات كانت أعلى منها فى الجليسريدات الثلاثية على عكس الخنزير .

وأظهرت نتائج تحليل الجليسريدات الثلاثية - كما هو متوقع - دهن الخنزير ودهن البقر لهم نفس (تصور) مشابهات الأحماض الدهنية الرئيسية تقريباً وعلى ذلك عندما يوجد فرق بينهم نجد أن هذا الـفرق البسيط لا يسمح باكتشاف دهن الخنزير فى دهن البقر اعتماداً على تركـيب الجليسريدات الثلاثية . أما فى الـ ٢ أحادى جليسريدات فإنــه يظهر اختلاف معقولاً بين النسب التـقريبية للأحماض الدهنية الموجودة به فى كلاً من دهن الخنزير ودهن البقر .

والجدول رقم (٥) يظهر التفاوت الكبير .

الجدول رقم (٣) : الأحماض الدهنية الرئيسية الموجودة فى الجليسريدات الثلاثية

والـ ٢ أحادى جليسريدات لدهن الخنزير

الأحماض الدهنية	الجليسريدات الثلاثية	الـ ٢ أحادى جليسريدات
ك$_{١٤}$: صفر	١,٩٠	٤,٦١
ك$_{١٦}$: صفر	٢٥,٥٧	٦٥,٧٩
ك$_{١٦}$: ١ (٧)	٢,٤٨	٣,٨٩
ك$_{١٨}$: صفر	١٤,٨٤	٤,٠٠
ك$_{١٨}$: ١ (٩)	٣٩,٥٦	١٣,٦٢
ك$_{١٨}$: ١ (٧)	٢,٩١	١,٢٦
ك$_{١٨}$: ٢ (٦)	٨,١٣	٣,٨٠
ك$_{٢٠}$: صفر	٠,٢٧	٠,٤٨

الجدول رقم (٤) : الأحماض الدهنية الرئيسية الموجودة فى الجليسريدات الثلاثية

والـ ٢ أحادى جليسريدات لدهن البقر

الأحماض الدهنية	الجليسريدات الثلاثية	الـ ٢ أحادى جليسريدات
ك$_{١٤}$: صفر	٤,١٢	٨,١٨
ك$_{١٦}$: صفر	٢٦,٦٦	١٥,٧٦
ك$_{١٦}$: ١ (٧)	٢,٦٢	٤,١١
ك$_{١٨}$: صفر	٢٤,٩٦	١٢,٤٨
ك$_{١٨}$: ١ (٩)	٣٠,٥١	٤٥,١٢
ك$_{١٨}$: ١ (٧)	٤,١٨	١,٢٩
ك$_{١٨}$: ٢ (٦)	١,٢٨	٢,٢٣
ك$_{٢٠}$: صفر	٠,٣١	٠,٧١

الجدول رقم (٥)

النسبة المئوية بالمول للأحماض الدهنية الموجودة فى الجليسريدات الثلاثية لدهن الخنزير ودهن البقر

العينة	ك$_{١٦}$: صفر		ك$_{١٨}$: صفر		ك$_{١٨}$: ١ ( )	
	الجليسريدات الثلاثية	الـ ٢ أحادى جليسريدات	الجليسريدات الثلاثية	الـ ٢ أحادى جليسريدات	الجليسريدات الثلاثية	الـ ٢ أحادى جليسريدات
دهن الخنزير	٢٥,١٦	٦٥,٨	١٤,٨	٤,٠	٣٩,٦	١٣,٦
دهن البقر	٢٦,٧	١٥,٨	٢٥,٠	١٢,٥	٣٠,٥	٤٥,١

النتائج السابقة قد تم الحصول عليها من دهن الخنزير والبقر المعروضة تجارياً وتم شراء عدة قطعيات من لحم الخنزير والبقر والغنم وفصل الدهن الموجود تحت الجلد من العضلات وأمكن تقدير صور مشابهات مركبات الأحماض الدهنية فى الجليسريدات الثلاثية والـ ٢ أحادى جليسريدات لتقييم مدى الفرق المحتمل بين دهن الخنزير ودهن البقر .

جرى توضيح الأحماض الدهنية المتحصل عليها فى الملحق .

الجدول رقم (٤) يحوى ملخصاً للنتائج ، كانت أهم الأحماض الدهنية هى حمض البالمتيك (ك$_{١٦}$: صفر) ، حمض الاستياريك (ك$_{١٨}$: صفر) حمض الأوليك (ك$_{١٨}$: ١(٩)) هى :

١ - فى الخنزير كانت نسبة حمض البالموتيك فى الـ ٢ أحادى جليسريدات تقريباً ٣ أضعاف نسبته فى الجليسريدات الثلاثية . أما نسبة حمض الأوليك ففى الـ ٢ أحادى جليسريدات فكانت تقريباً أقل بمقدار ٤ أمثال نسبة فى الجليسريدات الثلاثية .

٢ - فى البقر كانت نسبة حمض البالمتيك فى الـ ٢ أحادى جليسريدات تقريباً نصف نسبته فى الجليسريدات الثلاثية ، أما نسبة حمض البالمتيك فى العضلات فلم يكن هناك تغيير يمكن تقديره . نسبة حمض الأوليك فى الـ ٢ أحادى جليسريدات كانت أعلى كما كانت عليه فى الجليسريدات الثلاثية .

الجدول رقم (٦)

النسبة المئوية بالمول لأهم لأحماض الدهنية الموجودة

فى الجليسريدات الثلاثية والـ ٢ أحادى جليسريدات

العينة	ك١٦ : صفر		ك١٨ : ١(٩)		ك١٨ : صفر	
	الجليسريدات الثلاثية	الـ ٢ أحادى جليسريدات	الجليسريدات الثلاثية	الـ ٢ أحادى جليسريدات	الجليسريدات الثلاثية	الـ ٢ أحادى جليسريدات
دهن الخنزير نقى	٢٦	٦٦	٤٠	١٤	١٥	٤
دهن لحم الخنزير	٢٣	٦٤	٣٩	١١	١٢	٣
دهن لحم الخنزير	٢٤	٦٦	٣٨	١١	١٣	٤
دهن عضلات الخنزير	٢٤	٥٣	٣٥	١٦	١٨	٨
دهن البقر نقى	٢٥	١٦	٢٩	٤٥	٢٤	١٣
دهن لحم البقر	٢٥	١٠	٤٤	٥٥	٩	٤
دهن عضلات الخنزير	١٩	٢٣	١٨	٤٢	٢٣	١٥
دهن الغنم	٢٥	١٦	٢٧	٤٥	٢١	١٢
دهن عضلات الغنم	١٧-٢٠ *	١٩	٢٣-٢٩ *	٤٩	١٣-١٩ *	١٢

(*) أرقام من المراجع

نتيجة : اختلاف توزيع حمض البالمتيك وحمض الأوليك داخل الجليسريدات الثلاثية للعضلات فقى كل من دهن البقر ودهن الخنزير فإنه يمكن استخدام نسبة هذين الحمضين الـ ٢ أحادى جليسريدت للدلالة على وجود دهن الخنزير فى دهن البقر . هذه النتيجة يمكن استخدامها أيضاً للكشف عن دهن الخنزير فى دهن الضأن (الخروف) رغم قلة الطلب عليه غالباً .

الجدول رقم (٧) يبين نسب $\frac{\text{ك}_{١٦} : \text{صفر}}{\text{ك}_{١٨} : ١(٩)}$ المتحصل عليها من المعلومات المتوفرة .

العينة	$\text{ك}_{١٦}$: صفر	$\text{ك}_{١٨}$: ١(٩)	$\frac{\text{ك}_{١٦} : \text{صفر}}{\text{ك}_{١٨} : ١(٩)}$
دهن الخنزير	٦٦	١٤	٤,٧
دهن لحم الخنزير	٦٤	١١	٥,٨
دهن لحم الخنزير	٦٦	١١	٦,٠
دهن عضلات الخنزير	٦١	١٦	٣,٨
دهن البقر	١٦	٤٥	٠,٣٦
دهن لحم البقر	١٠	٥٥	٠,١٨
دهن عضلات الخنزير	٢٣	٤٢	٠,٥٥
دهن الخروف	١٦	٤٥	٠,٣٦
دهن عضلات الخروف	١٩	٤٩	٠,٣٩

إذا أمكن فصل دهن الخنزير ودهن البقر بدرجة معقولة ، وإذا افترضنا أن النسبة $\frac{\text{ك}_{١٦} : \text{صفر}}{\text{ك}_{١٨} : ١(٩)}$ لهذه العينات تمثل متوسط القيمة فيمكن بعد ذلك التنبؤ بالآتى :

العينة	$ك_{١٦}$: صفر / $ك_{١٨}$: ١ (٩)
دهن الخنزير	٤,٧
دهن البقر	٠,٣٦
٢ ٪ دهن خنزير فى دهن البقر (يتنبأ أن تكون)	٠,٣٨
٥ ٪ دهن خنزير فى دهن البقر (يتنبأ أن تكون)	٠,٤٣
١٠ ٪ دهن خنزير فى دهن البقر (يتنبأ أن تكون)	٠,٥٠

إذا افترضنا - كما قلنا من قبل - أن النسب ٠,٣٦ ، ٤,٧ تعتبر نموذجية مثالية فى دهن البقر ودهن الخنزير على الترتيب فيمكن نظرياً الكشف عن وجود دهن الخنزير ودهن البقر عند تركيز أقل من ٢ ٪ .

ولكن عملياً نجد أن هذه النسب تتعرض لتغيير طبيعى فى نسبة صور مشابهات الأحماض الدهنية لذا فإن لنسبة ٠,٣٦ المذكورة لا تمثل وجود دهن الخنزير .

استخدمت الدكتورة ليلى السيد وأمانى الدشلوطى ما يسمى «معامل الإثراء بحمض البالمتيك» وهو نسبة حمض البالمتيك فى الـ ٢ أحادى جليسريدات على نسبة فى الجليسريدات الثلاثية للكشف عن وجود دهن الخنزير . هذا العامل قد حسب من المعلومات المتاحة عن عديد من الدهون المبينة فى جدول رقم (٨) .

ومرة ثانية يمكن التنبؤ بالآتى باعتبار أن نتائج دهن الخنزير ودهن البقر تمثل متوسط القيم .

العينة	معامل الإثراء بحمض البالمتيك
دهن الخنزير	٢,٥
دهن البقر	٠,٦٤
٢ ٪ دهن خنزير فى دهن البقر (يتنبأ أن تكون)	٠,٦٨
٥ ٪ دهن خنزير فى دهن البقر (يتنبأ أن تكون)	٠,٧٤
١٠ ٪ دهن خنزير فى دهن البقر (يتنبأ أن تكون)	٠,٨٤

يظهر معامل الإثراء بحمض البالمتيك ، عيب واحد وهو أن هذا المعامل المرتفع فى دهن البقر نجده يقلل من الحد الذى يمكن عنده الكشف عن دهن الخنزير إذا كانت هناك عضلات خنزير موجودة فى المواد الغذائية المعرضة للحرارة ، وهذا الأمر يتطلب مزيد من البحث .

الجدول رقم (٨) : حساب معامل الإثراء بحمض البالمتيك

العينة	النسبة المئوية لحمض البالمتيك بالمول		معامل الإثراء بحمض البالمتيك
	الجليسريدات الثلاثية	الـ ٢ أحادى جليسريدات	
دهن الخنزير	٢٦	٦٦	٢,٥
دهن لحم الخنزير	٢٣	٦٤	٢,٨
دهن لحم الخنزير	٢٤	٦٦	٢,٨
دهن عضلات الخنزير	٢٤	٥٣	٢,٢
دهن البقر	٢٥	١٦	٠,٦٤
دهن لحم البقر	٢٥	١٠	٠,٤٠
دهن عضلات البقر	١٩	٢٣	١,٢
دهن الخروف	٢٥	١٦	٠,٦٤
دهن عضلات الخروف	١٧-٢٠	١٩	١

المخاليط القياسية من دهن الخنزير ودهن البقر :

من أجل اختبار مـدى قيمة النسبة $\frac{\text{ك}_{١٦} : \text{صفر}}{\text{ك}_{١٨} : ١(٩)}$ عملياً لـلكشف عن دهن الخنزير ودهن البقر ، وأمـكن تحضير مخاليط معلومة مسبـقاً من هذين النوعين من الدهن ، تم ذلك بـتجهيز محاليـل من دهن الخنزير + دهن بقـر مذوبة فى الهكسان وخلط الاثنين بنسبة معلومة مع بعض ٢ ٪ ، ٥ ٪ ، ١٠ ٪ ، ١٥ ٪ ، ٢٠ ٪ ، وجرى التخلص من المذيب قبل التحليل .

الملحق المرفق يوضـح صور مشابهات الأحماض الدهنية الـرئيسية الموجودة فى الجليسريدات الثـلاثية والـ ٢ أحادى جـليسريدات فى كل من دهـن الخنزير ودهن البقر والنسب $\frac{\text{ك}_{١٦} : \text{صفر}}{\text{ك}_{١٨} : ١(٩)}$.

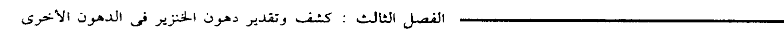
والجدول رقم (٩) يـوضح «معـامل الإثراء بحـمض البـالمتيـك» والأرقام المدونة تمثل متوسط ٥ تقديرات .

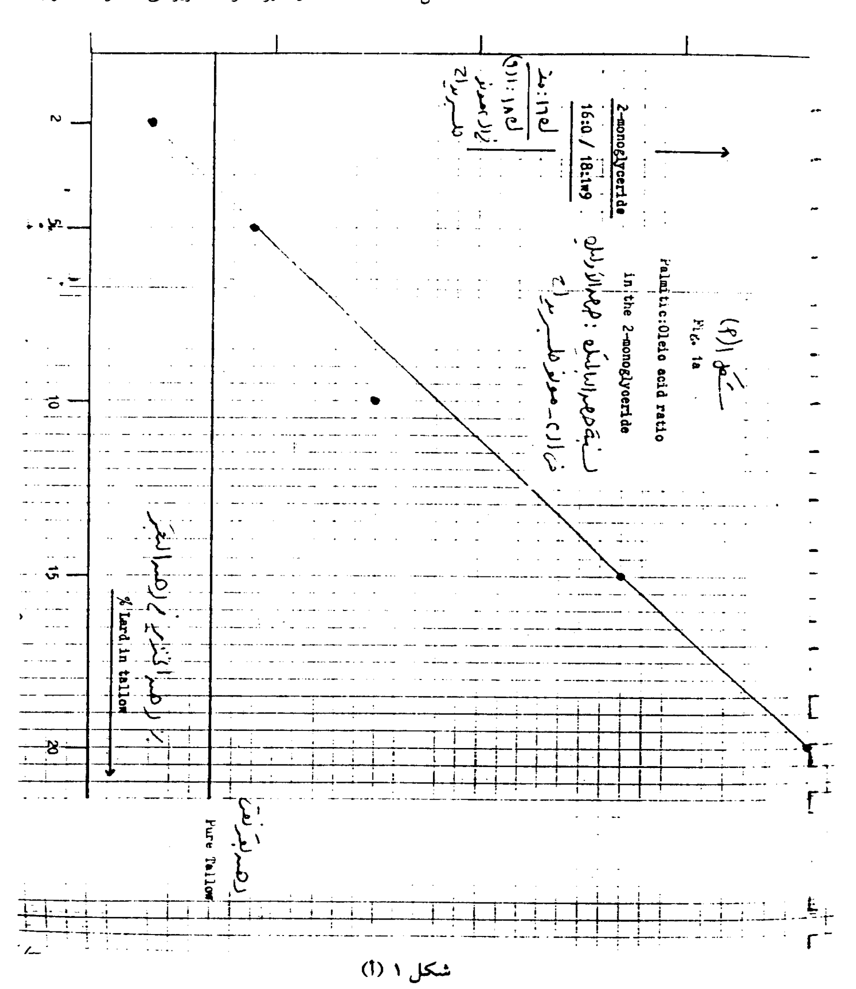
الـنتائج الواردة فـى الجدول رقم (٩) مـوضحة بالأشكـال (أ) ، (ب) تبين نسبة $\frac{\text{ك}_{١٦} : \text{صفر}}{\text{ك}_{١٨} : ١(٩)}$ فـى الـ ٢ أحـادى جليـسريدات وعـامل الإثراء بحـمض البالمتـيك . هذه النسبة يمـكن استخدامها لـلكشف عن وجود دهن الخـنزير فى دهن البقر ، إلا أن الحد أو التركيز الذى يمكن عند اكتشاف دهن الخنزير لـم يتم تقديره بدرجة يمكـن الاعتماد عليها من الجدول (٩) والأشكال (أ) ، (ب) نجد بها أنه عند خـلط دهن الخنزير مع دهن البقـر بنسبة ٢ ٪ يعطى نتـيجة أقل من المتحصل عليها بالنسبة لدهن البـقر . من هذه الأشكال يتبين لنا أن نسبة الدهن للخنزير فـى دهن البقر لا تبدأ من الصفـر لأن النتائج المعملية أقـل من النظرية السبب فى ذلك يحتاج إلى مزيد من البحث .

جدول رقم (٩)

العينة	جليسريدات ثلاثية ك١٦ : صفر / ك١٨ : ١(٩)	٢ أحادى جليسريدات ك١٦ : صفر / ك١٨ : ١(٩)	معامل الإثراء بحمض البالمتيك ك١٦ : صفر
دهن الخنزير	٠,٦٥	٤,٣٤	٢,٤٦
دهن البقر	٠,٨٦	٠,٣٦	٠,٦٣
٢ ٪ دهن خنزير فى دهن البقر	٠,٨٩	٠,٣٣	٠,٥٤
٥ ٪ دهن خنزير فى دهن البقر	٠,٨٠	٠,٣٩	٠,٧١
١٠ ٪ دهن خنزير فى دهن البقر	٠,٨٢	٠,٤٥	٠,٧٥
١٥ ٪ دهن خنزير فى دهن البقر	٠,٧٨	٠,٥١٨	٠,٨٧
٢٠ ٪ دهن خنزير فى دهن البقر	٠,٨٢	٠,٦٦	٠,٩٣

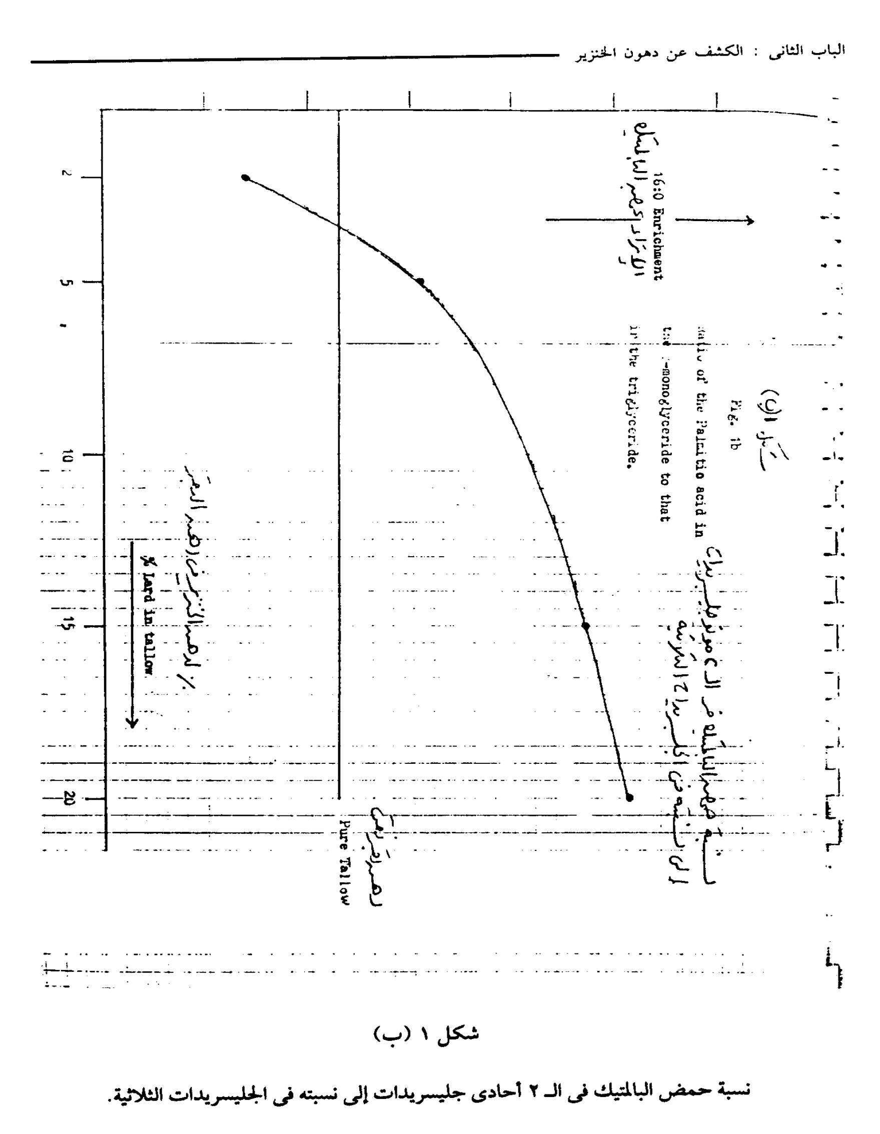
يمكن بواسطة هذه الطريقة الموضحة فى هذا التقرير الكشف عن وجود دهن الخنزير بتركيز ٥ ٪ فأعلى بدرجة معقولة يمكن الوثوق بها أو الاعتماد عليها ، إلا أنه يتبقى القيام بمزيد من الجهد لمعرفة الأسس التى يتوقف عليها الاختلاف فى هذه العوامل أو النسب المذكورة لأسباب طبيعية فى كلاً من دهن الخنزير ودهن البقر ولتقييم النتائج المتحصل عليها أيضاً للدهن المأخوذ من داخل العضلات وأيضاً من تحت الجلد نجد أن الطريقة المذكورة مع هذ البحث تصلح للكشف عن وجود دهن الخنزير فى الأغذية المعاملة بالحرارة أو (المعقدة) نستنتج بصفة عامة أن المشروع «تقدير دهن الخنزير فى الدهون الأخرى» قد أثبت أو برهن أنه يمكن الكشف عن وجود دهن الخنزير حتى تركيز ٥ ٪ وتحديد هذه النسبة كمياً باستخدام الطريقة الواردة فى هذا التقرير .





شكل ١ (أ)

نسبة حمض البالمتيك : حمض الأوليك فى الـ ٢ أحادى جليسريدات



شكل ١ (ب)

نسبة حمض البالمتيك فى الـ ٢ أحادى جليسريدات إلى نسبته فى الجليسريدات الثلاثية.

الفصل الرابع

طريقة قياسية لتمييز دهون الخنزير فى الزيوت والدهون المهدرجة

جامعة الدولة العربية ١٩٧٢



الفصل الرابع

طريقة قياسية لتمييز دهون الخنزير فى الزيوت والدهون المهدرجة

أساس الطريقة :

تعتمد الطريقة على فصل جلـيسريدات الدهن أو الزيت المهدرج أو الخليط تفريدياً عن طريق بلورتها جزئياً من الأسيتون ثم تقدير الثوابت المختلفة للأجزاء المنفصلة عند درجات حرارة مختلفة .

الكواشف :

- أسيتون نقى .
- يود نقى .
- حمض خليك (٩٩,٥ ٪) .
- بروم .
- ثيوكبريتات الصوديوم .
- يوديد البوتاسيوم .
- صودا كاوية نقية .
- جليسرين نقى .
- كبريتات فضة .
- هيدروكسيد باريوم .
- محلول فيتولفثالين (دليل) .

خطوات العمل :

- يوضع حوالى ٥٠ جم من عينة المادة الدهنية فى دورق مخروطى جاف ونظيف سعته ٢٥٠ مل ، ويضاف إليها الأسيتون تدريجياً (حوالى ١٠٠ مل) ويغلى الخليط على حمام مائى أو مسطح كهربائى حتى تمام الذوبان والحصول على محلول رائق - تزاد كمية الأسيتون أو تقلل إذا لزم الأمر.
- يرشح الخليط وهو سخن خلال ورقة ترشيح مثناه ويركز السائل الراشح بتسخينه على حمام مائى حتى يبدأ الراشح فى التعكير ، ثم يترك ليبرد عند درجة حرارة الغرفة (لا تزيد على ٢٠ ° م) حتى تنفصل البلورات .
- يتم الحصول على البلورات بالترشيح فى قمع بختر تحت ضغط منخفض تم غسل البلورات بقليل من الأسيتون البارد وتوضع فى مجفف به كلوريد كالسيوم ويفرغ المجفف ويحتفظ بهذا الجزء البلورات الموجودة فوق ورق الترشيح ويطلق عليه الجزء (أ) .
- يقطر الأسيتون تماماً من السائل الراشح بعد فصل البلورات على حمام مائى ويحتفظ بالسائل الزيتى المتبقى ويطلق عليه الجزء (ب) .
- تقدر الثوابت التلية فى كل جزء على حده هى : رقم اليود - رقم ديخرت ميسيل - رقم بولنسكى - رقم كرشنر .
- تقارن الثوابت المقدرة لتمييز أنواع الدهون وفقاً للجدولين (١) ، (٢) .

جدول رقم (١)

يبين ثوابت الجزء (أ) المنفصل عند درجة حرارة ٢٠°م

الثوابت	زيت نباتي مهدرج	دهن حيواني (غير الخنزير)	دهن الخنزير
رقم اليود	٥١ - ٥٣	٢٥ - ٣٠	٢٧ - ٣٠
رقم رايخرت ميسيل	٢,٥ - ٢,٧	٢,٥ - ٣,٥	٩ - ١٠
رقم بولنسكى	٠,٧ - ٠٨٫	٠,٨ - ١,٢	٠,٧ - ٨٫
رقم كرشنر	١,٨ - ٢	١,٥ - ١,٨	٦ - ٧

جدول رقم (٢)

يبين ثوابت الجزء (ب) المتبقى بعد تقطير الأسيتون

الثوابت	زيت نباتي مهدرج	دهن حيواني (غير الخنزير)	دهن الخنزير
رقم اليود	٧٥ - ٨٠	٤٥ - ٦٠	٦٢ - ٦٨
رقم رايخرت ميسيل	٣,٥ - ٤,٥	٣ - ٣,٥	٧ - ٧,٥
رقم بولنسكى	٠,٥ - ٠,٩	٠,٨ - ١,٤	٠,٥ - ٠,٦
رقم كرشنر	٢,٥ - ٢,٥	٣ - ٤,٥	٦,٥ - ٧,٢

النتيجة :

الزيوت النباتية المهدرجة تمتاز بما يلى :

الجزء (أ) يكون رقم اليود أعلى من ٥٠ ، ولا يزيد كل من رقم رايخرت ميسيل على ٣ ، ورقم كرشنر على ٢ .

الجزء (ب) يكون رقم اليود أعلى من ٧٠ ولا يزيد كل من رقم رايخرت ميسيل على ٤,٥ ورقم كرشنر على ٢,٥ .

الدهون الحيوانية (غير الخنزير) : تتميز بما يلى :

الجزء (أ) لا يزيد كل من رقم اليود ٣٠ ورقم رايخرت ميسيل على ٣,٥ ، ورقم كرشنر على ٢ .

الجزء (ب) لا يتجاوز رقم اليود ٦٠ ولا يزيد كل من رقم رايخرت ميسيل على ٣,٥ ورقم بولنسكى على ١,٥ ورقم كرشنر على ٤,٥ .

- تمييز دهن الخنزير فى خليط الدهون :

الجزء (أ) :

إذا كان رقم اليود أعلى من ٥٠ فإن أى زيادة مقدارها ٠,٥ (نصف وحدة) فى كل من رقم رايخرت ميسيل عن ٣ ورقم كرشنر عن ٢ تدل على وجود دهن خنزير مضاف بنسبة حوالى ١٥ ٪ .

إذا كان رقم اليود لا يزيد عن ٣٠ فإن أى زيادة مقدارها ٠,٥ (نصف وحدة) فى رقم رايخرت ميسيل على ٣,٥ وفى رقم كرشنر على ٢ تدل على وجود دهن خنزير .

الجزء (ب) :

إذا كان رقم اليود أعلى من ٧٠ فإن أى زيادة مقدارها ٠,٥ (نصف وحدة) فى رقم رايخرت ميسيل على ٤,٥ وفى رقم كرشنر على ٢,٥ تدل على وجود دهن خنزير مضاف بنسبة حوالى ٢٠ ٪ .

إذا كان رقم اليود من ٦٠ إلى ٦٥ فإن أى زيادة مقدارها ٠,٥ (نصف وحدة) فى رقم رايخرت ميسيل على ٣,٥ وفى رقم كرشنر على ٤,٥ تدل على وجود دهن خنزير مضاف بنسبة حوالى ٢٠ ٪ .

الفصل الخامس

تقدير دهون الخنزير والدهون الحيوانية والنباتية فى دهن الحليب

دى . برخت

بمعهد الكيمياء والفيزياء - محطة أبحاث الحليب الفيدرالية

كيل - المانيا لغربية ١٩٨٣



الفصل الخامس

تقدير دهون الخنزير والدهون الحيوانية والنباتية فى دهن الحليب

١ - مقدمة :

يقدر المستهلك أهمية منتجات الحليب التى توجد بحالة نقية وطبيعية ، كما يولى اهتماماً خاصاً بالمنتجات الطبيعية التى لا تتعرض بدرجة كبيرة للمعاملة الحرارية أو الخلط بمواد غذائية أخرى . ينطبق ذلك بدرجة كبيرة أيضاً على دهن الحليب الذى يتواجد بشكل كبير فى العديد من المنتجات مثل زبدة الحليب ، وتلك الأنواع التى يتم خلطها بدهون نباتية أو حيوانية مثل دهن البقر أو الخنزير والتى تمنع كثير من الدول مثل المانيا الغربية أو إيطاليا أو أسبانيا استعمالها .

لذا فإنه من الأهمية بمكان كتابة البيانات الإيضاحية بطريقة صحيحة على المنتجات التى تكون مخلوطة غالباً لا يمكن التعرف بسهولة على المنتجات المقلدة التى تستعمل أحياناً دهن نباتى كبديل أرخص لدهن الحليب على أنها منتجات مخلوطة خاصة فى حالة إضافة الدهون الغريبة بنسبة قليلة ، حيث تتداخل الجليسريدات الثلاثية الموجودة فى دهن الحليب مع تلك الموجودة فى الدهون النباتية ومن ثم يبقى التوزيع الإجمالى للجليسريدات الثلاثية داخلاً فى النطاق أو المدى الطبيعى لتوزيعه فى دهون الحليب النقية حيث يكون هذا المدى كبيراً بسبب تأثير التغذية وإفراز الحليب . لهذا السبب تفيد طرق الكشف الوصفية والكمية بصفة خاصة لإضافة الدهون النباتية والحيوانية الغريبة ذات أهمية شديدة .

فى محاولات لكشف الدهون الغريبة فى دهن الحليب استعملت طرق

عديدة مثل طرق التحليل الغازى الكروماتوجرافى للأحماض الدهنية أو للجليسريدات الثلاثية أو الاستيارينات وخلات الاستيارين أو طرق التحليل الحرارى مثل طريقة مسح التفاوت اللونى (الكلاريمترى) .

إلا أنه وحتى اليوم أحرزت نتائج جيدة فقط مع طريقة كشف الاستيارين حيث تم إدخالها كطريقة قياسية دولية مع طريقة كشف الجليسريدات الثلاثية . إلا أن طريقة كشف الاستيارين لا يمكنها تمييز وجود الدهون الحيوانية مثل دهن البقر أو دهن الخنزير فى دهن الحليب ، كما يمكن أيضاً إذا ما أضيف الكوليسترول على سبيل المثال أن تتغير نسبة الفيتوستيارينات إلى الكوليسترول لذا يصبح هذا الكشف بمساعدة الفيتوستيارينات أكثر صعوبة . ومازالت هناك وجهات نظر مختلفة حول السؤال الرئيسى فى طريقة كشف الاستيارين وهو هل يحتمل أن تتواجد كميات قليلة من الاستيارينات النباتية فى دهن الحليب ؟ أضافة إلى ذلك فإنه فى حالة غش دهن الحليب بكميات ضئيلة لابد من اتخاذ الحذر والعناية الشديدين عند إجراء التقدير وتفسير نتائج كشف الاستيارين .

أيضاً قد تحدث مشاكل مع طريقة الكشف هذا خاصة إذا ما استعملت الاستيارينات كمواد تسويقية لكشف ترسيب دهن الحليب مثلاً ثم يعقب ذلك أن تؤخذ هذه الدهون الحليبية وتختبر لكشف وجود دهون غريبة .

لا توجد سوى مراجع نادرة فى كل ما كتب عن طرق كشف الدهن الغريب فى دهن الحليب . من وجهة نظرنا إستناداً إلى المعلومات التى حصلنا عليها من دراسات عديدة أجريت على مخاليط دهن الحليب مع دهون غريبة فإن نتائج طريقة تايمز (٨) المبنية على تحليل الجليسريدات الثلاثية تعتبر غير مرضية ، حيث لوحظ وجود اختلافات عديدة فى الجليسريدات الثلاثية المنفردة فى عينات دهن الحليب الاسترالى عن تلك الموجودة فى دهون الحليب الأوروبية وذلك بسبب تأثير نظام التغذية المتبع .

الطرق المتبعة فيما يلى طور فيها طرق تحليل الجليسريدات الثلاثية التى أعطت دلائل مشجعة ، وأيضاً طرق تقييم النتائج أحصائياً من أجل الوصول لوسائل محسنة لكشف الدهن الغريب انطلاقاً من هذه النقطة ، وبصفة خاصة من أجل السماح بإجراء التقدير الكمى لسلسلة كبيرة من الدهون النباتية والحيوانية فى دهن الحليب .

٢ - المواد الخام والطرق المتبعة :

- تم تحضير ٧٥ عينة دهون حليبية مختلفة من المانيا الاتحادية ، و ١٥ عينة دهون حليبية من ٦ دول أوربية أخرى ، وذلك بصهر عينات الزبد عند ٥٠ ° س ثم ترشيح الدهن .
- إضافة لهذه العينات أختبرت ٢٠ عينة نقية من الدهون الغريبة النباتية والحيوانية ، وكذلك ٢٤ عينة دهون حليبية مضاف إليها دهن غريب بنسبة ٢ ٪ ، ٢٣ عينة دهون حليبية مضاف إليها دهن غريب بنسبة ١٥,٣ ٪ ، و ٣٣ عينة دهون حليبية مع دهنين غريبين تم إضافتهما معاً بنسبة (٥ - ٨ ٪) .
- تم شرح طريقة تقدير الجليسريدات الثلاثية بالأعمدة المعبأة بالكروماتوجرافيا الغازية بالتفصيل بالمراجع أرقام (١٤ ، ١٥) .

أثناء التقدير حدث أرتباط أو اتحاد بين الجليسريدت الثلاثية التى تحتوى على عدد فردى من ذرات الكربون الحامضية (الأسيل) (٢ ن + ١) وبين الجليسريدات الثلاثية التى تسبقها وتحتوى على عدد (٢ ن) . كما أهملت الجليسريدات التى تحتوى على ٥٦ ذرة كربون نتيجة عدم تطابق نتائجها وسهولة تكرار الحصول عليها وبالنسبة للجليسريدات المتبقية المحتوية على كوليسترول فقد تدرجت حتى ١٠٠ ذرة كربون .

كما جرى تقدير محتوى الجليسريدات الثلاثية لمختلف أنواع الدهون الغربية بنفس الطريقة . أجريت المعايرة بمعاونة ٨ جليسريدات ثلاثية مشبعة مختلفة (مؤسسة أنايو ، شيك برباريشن ، إليسيان ، الولايات المتحدة الأمريكية) هذا مكن من معايرة قياس توزيع الجليسريدات الثلاثية فى عينة الدهن المختبر التى حققت بعد ذلك ٢ - ٣ مرات يومياً حتى وصلت لحالة الثبات .

ثم تقدير محتويات الجليسريدات الثلاثية فى مختلف الدهون الحليبية المختبرة باستعمال طريقة الكروماتوجرافيا الغازية لم تستعمل الأعمدة الكروماتوجرافيا المعبأة القصيرة وأستعملت أنابيب شعيرية من السليكا المنصهرة طولها من ٢ - ٢٥ متر . هذه الأنابيب الشعيرية ذات مقدرة عالية على فصل وتمييز ما يقرب من ١٥٠ جليسريداً ثلاثياً مختلفاً خاصة الجليسريدات الثلاثية المشبعة وغير المشبعة التى لها نفس العدد من ذرات الكربون الحامضية (الأسيل) .

ومع ذلك أظهرت التقديرات الكمية المتكررة للجليسريدات الثلاثية المرتفعة فى نقطة غليانها بعض المشاكل . لذا فإنه من المهم الحصول على نتائج كمية صحيحة عند التحليل هذا من ناحية ، ومن ناحية أخرى يجب أن تكون طريقة التقدير روتينية وسريعة بقدر الأمكان .

أجريت جميع التحليل بأعمدة ذتية التعبأة .

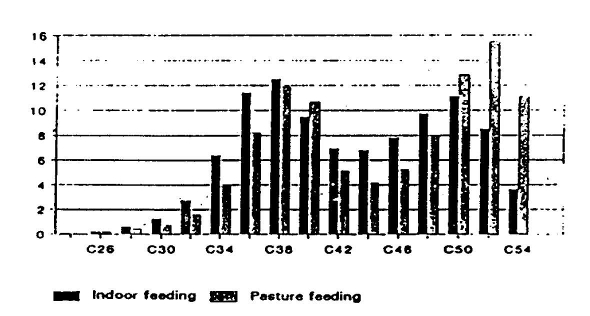
٣ - النتائج والمناقشة :

عادة ما يكون دهن الحليب مقتصراً فى تركيبه على خليط من الجليسريدات الثلاثية المحتوية على عدد ذرات كربون حامضية يتراوح ما بين ٢٤ إلى ٥٤ ذرة كربون . قد يتغير تركيب هذه الجليسريدات الثلاثية بدرجة كبيرة نتيجة تأثير نظام التغذية أو فترة أفراز الحليب أو العوامل الوراثية .

الـشكل رقم (١) يوضح التركيبـات المختلفة للجـليسريدات الثلاثـية لدهن الحليـب التى تتـأثر بفعـل نظام التغـذية . حيث يـوضح العمـود الأول توزيع الجليسريدات الثـلاثية لدهن الحليب الناتج من قطيع غـذى فقط على الأعشاب فى الهواء الطلق ، بينما يوضح العمـود المجاور توزيع الجليسريدات لثلاثية فى دهن الحليب الناتج من قـطيع جرى تغذيته دخل الحظائر على كميـة عالية نسبياً من الأعلاف المركزة (حوالى ٧ كجم / الوجبة) .

أسفل هـذه الأعمدة تم توضـيح العدد الـكلى لذرات الـكربون الحامـضية (عدد ذرات الكربون لـ ٣ أحماض دهنية فى جزئ الجليسريد الثلاثى) .

فى نظام التغذية على الأعشاب فى الـهواء الطلق نجد أن عدد الجليسريدات ذات السلاسل الطويلة ك٥٠ ، ك٥٢ ، ك٥٤ كان أكثر من عددها فى نظم التغذية الداخلى ، بينما كان عدد الجلـيسريدات ذات السلاسل القصيرة (ك٢٦ - ك٣٦) فى نظام التغـذية الداخلى المغلق أكثر مـن عددها فى نظام التغذية المـفتوح على الأعشاب فى الهواء الطلق صيفاً .



شكل (١) : تأثير نظم التغذية المختلفة للأبقار على تركيب الجليسريدات الثلاثية فى دهن الحليب الناتج منها

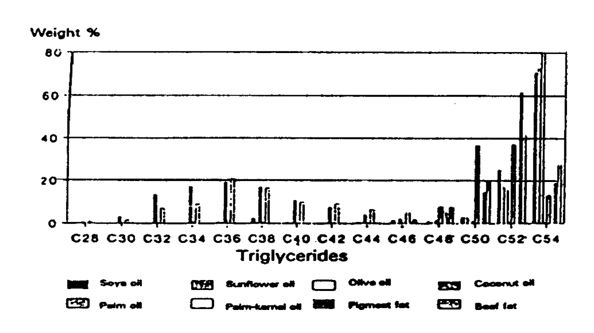
وجد أنه فى نظام التغذية على الأعشاب صيفاً تزداد نسبة الأحماض الدهنية التى عـدد ذراته ١٨ ذرة كربـون داخل الجلـيسريدات الـثلاثيـة ذات السلسـلة الطويلة خاصة ك$_{٥٤}$ حيث تصل نسبة ك$_{١٨ : ٣}$ إلى حوالى ٥٠ ٪ ، ك$_{١٨ : ٢}$ إلى حوالى ١٥ - ٢٥ ٪) يرتبط ذلك بارتفاع نسبة الدهن فى العلف .

وبسبب عملية الهدرجة التى تحدث فى المـعدة الأولى للحيوان والتى يتبعها إزالة (نزع) التشبع فى الـغدة اللبنية تتكون نسبة عالـية من حمض الأوليك فى دهن الحلـيب تنتج مـن الأحماض الدهـنية عديدة الـتشبع التـى تكون مقـترنة بالجليسريدات الثلاثية طويلة السلسلة .

يحدث الـعكس فى فصـل الشتاء حيث تـنخفض نسـبة الدهن فى الـعلف ونتيـجة لذلك يحـدث أنخفاض حاد فى تـخليق الأحمـاض الدهنية فـى الغدة اللـبنية فـتزداد تبعـاً لذلك نسـبة الأحماض الـدهنية مـقيدة السـلسلة ومـن ثم الجليسريدات الثلاثية ذات العدد المنـخفض من ذرات الكربون الحامضية . أيضاً تم بواسطة التحليل بالكروماتوجرافيا الغـازية تقدير تركيب الجليسريدات الثلاثية للزيوت النباتية (زيت فول الصويا ، زيت دوار الشمس ، زيت الزيتون ، زيت جوز الهند ، زيت النخيل ، زيت نواة النـخيل) وأيضاً للدهون الحيوانية (دهن الخنزير) ودهن البقر بعد فصلهما .

تم تحليل ٤ عينات مختلفة من الدهون الغريبة لتقدير مدى التذبذب فى كل مـن هذه الدهون الغريـبة المختلفة الـشكل رقم ٢ يوضح توزيع الجلـيسريدات الثلاثية فى دهون نبـاتية وحيوانية غريبة مختلفـة ، حيث نرى أن كلاً من زيت جوز الهند وزيت نواة النـخيل (بسبب ارتفاع نسبة حمض اللـوريك فيهما) هما فقط الـدهنان أو الزيتـان الغريبان الـلذان يحتوين عـلى كمية كـبيرة نسبـياً من الجليسريدات الثلاثية القصيرة والمتوسطة السلسلة فى مجال يتراوح ما بين ك$_{٣٢}$، ك$_{٤٢}$. أما بـاقى الدهـون النباتـية والحيـوانية الأخـرى فيغـلب على تـركيـبها

الجليســريدات الطويلة السلــسلة التى طولها يــتراوح ما بين ك٤٨ ، ك٥٤ بسبب ارتفــاع نسبة الأحــماض الطويــلة السلــسلة بــها وهى البــالمتيك ، الأولــيك ، اللنيوليك .

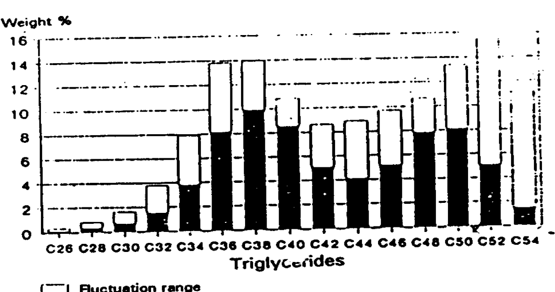


شكل (٢) : توزيع الجليسريدات الثلاثية فى مختلف الزيوت والدهون النباتية والحيوانية

وتبــعاً لذلك يمــكن الاعتقــاد أن أضافة هــذه الدهون الغــريبة إلى الــدهون الحلــيبية الموضح توزيع جليسريداتها الثــلاثية فى الشكل رقم (١) يمكن اكتشافه بسهولة بطرق القياس بالكروماتوجرافــيا الغازية إلا أن الصعوبات تظهر فقط عند وجود تذبذبات كبيرة داخل أى من الجليسريــدات الثلاثية التى يتكون منها دهن الحليب .

أجريت خــلال مدة تزيد على ٥ سنوت دراسة لقياس تأثير نــظم التغذية أو أفراز الحليب أو الوراثة عــلى مدى التذبذب أو التغير فى الجليــسريدات الثلاثية المحتوية على ٢٦ إلى ٥٤ ذرة كربون حامضية وذلــك بالتحليل الكروماتوجرافى

الغازى لـ ٧٥٥ عينة دهن حـليب مختلفـة منها ٤١٢ عينة أعتمدت عـلى نظم التغذية المغلق و ٣٤٣ عينة اعتمدت على نظم التغذية المفتوح صيفاً حيث غذيت على أفضل أنواع الأعشاب مزجت عينات دهن الحليب مع بعضها والتى جمعت من سلالات ماشية متنوعة فى مناطق مختلفة بالمانيا الغربية .



شكل (٣) : مدى التذبذبات فى الجليسريدت الثلاثية لـ ٧٥٥ عينة مختلفة من دهن الحليب

فى الشكل رقم (٣) تمثل الأجزاء البيـضاء فى كل عمود على حده الحدود الدنيا والقصوى لمدى التذبذب فى كل جليسريد ثلاثى .

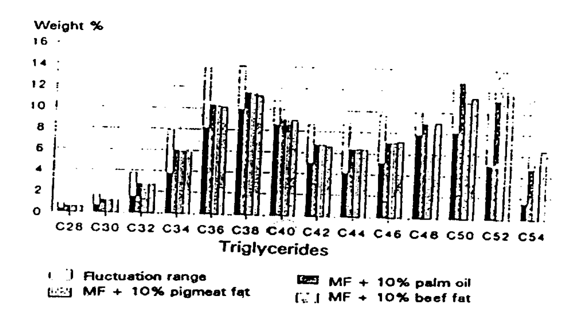
بمقارنة النتائج الموضحة هنا مع دراسات سابقة أجريت نجد أن المصادر التى أخذت منها العينات فى هذا بحث كثيرة لذا تعتبر هذا الطريقة من الطرق المحسنة لكشف الدهون الغريبة .

يظهر الـشكل رقم (٣) أن أكبر تذبذب يـحدث فى السلاسل الطويـلة التى عدد ذرات الكربون به يتراوح ما بين ٥٢ إلى ٥٤ ذرة ك ، مما ينشأ عنه صعوبة

فى كـشف الدهن الـغريب بهـا حيث نجد أن الـعدد الأكيد مـن الجليسـريدات الثلاثية لمنظم الدهون النباتية والحيوانية يتواجد فى هذا النطاق .

السؤال الأساسى فى معظم طرق كشف الدهن الغريب المعتمدة على تحليل الأحماض الـدهنية أو الجلـيسريدات هو هل مـحتويات الجلـيسريدات الثـلاثية المختلفة لعيـنة دهن الحليب تحت الاختبار (المخلوطة بـدهن غريب) تظل داخل أقصى نطاق لتذبذب دهن الحليب الطبيعى (كما هو موضح بالشكل رقم ٣) .

فى تجارب أخرى أجريت أضيـف إلى دهن الحليب ١٠ ٪ زيت نخيل ، و ١٠ ٪ دهن خـنزيـر ، و ١٠ ٪ دهن بقـر ، والشكـل رقم (٤) يوضـح مدى التذبذب فى هـذه العينات الثلاثة مـن دهن الحليب المدعومة بـدهون غريبة (٣ أعمدة مقارنة بالعمود الأول الذى يمثل مدى التذبذب فى ٧٥٥ عينة دهن حليب نقى جرى اختبارها كما هو موضح بالشكل رقم (٣) .



شكل (٤) : مقارنة بين مدى التذبذبات فى الجليسريدات الثلاثية فى مخاليط دهن الحليب مع ١٠ ٪ من كل من زيت النخيل ، دهن لحم الخنزير ، دهن لحم البقر

ومن شكل (٤) نلـحظ أن جميع العينـات المضاف إليها دهن غريـب تبقى دخل نطق التذبذب لجميع الجليسريدت الثلاثية (فى دهن الحليب النقى) .

وعلى ذلك فإن فحص مدى التذبذب لا يـكفى بمفرده لاكتشاف هذا الغش المرتفع نسـبياً وفى دراسة أجريت بالكومبيوتر لـ ٧٥٥ عينة دهن حليب خلطت بـ ٨ دهون غـريبة ، وأعتـبر أنه إذا وقع أحد الجـليسريـدات الثلاثيـة فى هذه المخاليط (دهن حليب + دهن غريب) خـارج مدى التذبذب الموضح فى الشكل رقم (٣) فإنها تسجـل كدهون غريبة . وقد أخذ فى الاعتبار بـذبذبات مختلف أنواع الدهون الغريـبة عند إجراء الحساب ليكون الـتطبيق العملى لهـذه الطريقة أكثر عمومية أظهرت النتائج مثلاً عدم اكتشاف غش دهن الحليب بـ ١٠ ٪ زيت جوز الهند ، استـناداً إلى الاختلاف فى التـذبذبات فى ٤٩٨ عينـة من بين الـ ٧٥٥ عـينة دهن حليب مخلوطة كمـا حدث ذلك أيضاً فى ٦٨٧ عينة من زيت نواة النخيل ، و ٣٥٥ عينة مع دهن الخنزير ، و ٥٣٦ عينة على دهن البقر .

لذا نشأ اعتقاد بأن نطاق التذبذبات التى تم تقديرها تعتبر كبيرة بدرجة عالية وتتـجاوز الأرقام التـى وردت فى بحث الـبارودى (٢٨) ، وتـايمز (٨) بـدرجة واضحة ويمكن القول بصورة مختصرة أن طرق الكشف المستعملة حالياً والمتخذة كأساس للتحليـل الكروماتوجرافى لتركيب الدهيد ، تعتـبر غير مرضية ، الأمر الذى دفعـنا إلى محاولـة تطوير طـريقة أكثر حـساسية لكـشف الدهن الـغريب بمعاونة الطرق الأحصائية .

الطريقة الموضحة فيما يلى تعتبر دقـيقة جداً وهى تعتمد على تقدير محتوى الجليسريدات الثلاثية بالتحليل الكروماتوجرافى الغازى .

وعند حساب المعادلات استبعدت بدرجة كبـيرة الأخطاء التى تنتج عن تأثير نظام التغذية والذى يسبب تغييـراً فى تركيب دهن الحليب الناتج من أنواع دهن حليب مختلفة .

فى عام ١٩٨٠ قدم تايمز (٨) المعادلة التالية للجليسريدات الثلاثية أرقام $ك_{٤٠}$ ، $ك_{٤٢}$ ، $ك_{٤٤}$ وقد تم استنتاجها من تحليل ٧٦ عينة دهن حليب استرالى مختلفة بطرق التحليل الاحصائى :

$$١٤,١٩٧ \times ك_{٤٠} - ٣٦,٣٩٦ \times ك_{٤٢} + ٣٢,٣٦٤ \times ك_{٤٤} = ٩٨,١٢ - ١٠١,٨٨$$

جميع دهون الحليب أعطت رقماً فى مدى ضيق من التذبذب أو التغير يتراوح ما بين ٩٨,١٢ إلى ١٠١,٨٨ عندما ضربت العوامل الثابتة المذكورة فى نسب الجليسريدات الثلاثية التى فى مدى يتراوح بين $ك_{٤٠}$ ، $ك_{٤٤}$.

إذا أعطت عينة دهن مجهولة رقماً أقل من ٩٨,١٢ أو أكثر من ١٠١,٨٨ باستعمال هذه المعادلة للجليسريدات الثلاثية فهناك احتمال كبير أن دهن الحليب هذا قد عّدل تركيبه .

حالياً أظهرت الحسابات التى أجريناها على الجليسريدات الثلاثية فى ٧٥ عينة دهن حليب مختلفة أنه لا يمكن لمعادلة تايمز أو أى معادلة أخرى كشف أضافة ١٥ ٪ من أى دهون غريب .

يرجع سبب عدم توصلنا إلى نتائج دقيقة بمعادلة تاميز ، حيث وجد تضارب بين نتائجنا والنتائج الناجحة التى سجلها الباحث الاسترالى ، إلى وجود تذبذبات كبيرة فى دهون الحليب التى درسناها . ومن ناحية أخرى فإن الاتحاد المكون من مجموعة الجليسريدات $ك_{٤٠}$ ، $ك_{٤٢}$ ، $ك_{٤٤}$ ليس هو التالف المناسب من الجليسريدات الثلاثية الذى يمكنه كشف الدهون الغريبة حيث أن الجليسريدات بسبب اختلاف نظام التغذية المتبع .

ثم حساب ٤٥٥ تآلف محتمل باستعمال الجليسريدات الـ ١٥ المتواجدة فى المدى من $ك_{٢٦}$ حتى $ك_{٥٤}$ وقد أمكن قياسها بدقة من معادلة عامة تشمل ٣ جليسريدات ثلاثية كما يلى :

$$أ \times ك_{1} + ب \times ك_{2} + جـ \times ك_{3} = ر$$

حيث تمثل الجليسريدات من $ك_{1}$ حتى $ك_{3}$ جليسريداً ثلاثياً فى المدى من $ك_{26}$ حتى $ك_{54}$ ، أو ١٣٦٥ معادلة معبراً عنها بـ ٤ تعابير (حدود) .

كان هدفنا هو إيجاد معادلات تشتمل على ١٥ حداً كحد أقصى ينطبق عليه الشروط الثلاثة التالية :

أولاً : أن يكون لها القدرة على كشف الدهن الغريب بدرجة حساسية .

ثانياً : إهمال التذبذبات التى تقع خارج نطاق الـ ١٠٠ فى الدهون الحليبية النقة أخذاً فى الاعتبار الأخطاء التى يمكن أن تحدث أثناء القياس .

ثالثاً : أن يكون الانحراف المعيارى لقيم (أر) صغيراً (عند المقارنة بالمعادلة العامة أعلاه) ، وأن يكون توزيع قيم (أر) لمختلف عينات دهن الحليب توزيعاً عادياً طبيعياً .

هذا الشرط الأخير يمكن من حساب حالات الغش المحتملة بدهن غريب .

أجريت بالحاسب الآلى ٣٢,٦٤٧ معادلة خطية لـ ٣ إلى ١٥ جليسريداً ثلاثياً موجودة فى مختلف عينات دهن الحليب .

وتم حساب متوسط الأنحرافات المعيارية ، ومدى الانحراف (التشتت) المطلق وأيضاً مداه باحتمال ٩٩ ٪ لقيم (أر) التى تنتج من التعويض عن قيمة الجليسريدات الثلاثية فى عينات دهن الحليب المختلفة وقد استنتجنا المعادلة التالية لحساب بداية حدوث الغش بأى دهن غريب (٢٧) .

٪ للحد الأدنى لكشف غش دهن الحليب بدهن غريب

$$= \frac{٢٠٠ \times ت \times سيجما}{(أر\ أف - ١٠٠) + ت \times سيجما}$$

حـيث ت : ٢,٥٨٦ أو ١,٩٦٥ (عند حدوث ثـقة ٩٩ ٪ أو ٩٥ ٪ على التوالى) .

سيجما : الانحراف المعيارى لجميع قيم (أر) لدهون الحليب

أر أف : قيـمة (أر) التى تـناسب الدهـن النقى الـغريب ونحـصل عليـها بالتعـويض عن (قيمة) نسـبة الجليسريدات الثـلاثية الموجودة فى لدهـن الغريب وذلك فى المعادلة العامة للجليسريدات الثلاثية للدهون الحليبية .

ومن أجـل كشف الدهـون الغريـبة كان لابد مـن إيجاد مـعادلات مثالـية تتأرجـح خلالها قيم (أر) لـلدهون الحليبـية النقيـة . فمثلاً كانت أدق مـعادلة لاكتشاف أضافة دهن البقر كما يلى :

١,٠٩٥٦ × ك$_{٣٦}$ + ٠,٥٨٢٩ × ك$_{٣٨}$ + ٤,١٢٤٩ × ك$_{٤٠}$

- ١,١٣٥٧ × ك$_{٤٢}$ + ١,٤٠٢٧ × ك$_{٤٤}$ + ١,٦٩٩٨ × ك$_{٤٦}$

+ ٠,٣١٩٢ × ك$_{٤٨}$ + ٢,٠٨٥٩ × ك$_{٥٠}$ = أر

حيث أر = ٩٨,٣٩ - ١٠٢,٥٣

المدى الذى تتأرجح خلاله قيمة (أر) بدرجة احتمال ٩٩ ٪ هو :

٩,٩١ - ١٠١,٠٩

وقد كان الانحراف المعيارى بجميع قيم (أر) كما يلى :

(سيجما) = ٤٢٠٦٢ ,

هذه المعادلة تعطينا طريقة مبسطة دون الحاجة لحاسب آلى (كمبيوتر) للتأكد ما إذا كان تركيب الجليسريدات الثلاثية لعينة الدهن التى لدينا يمثل مجموع نسب الجليـسريدات الثلاثـية المبينـة ، وأن قيم الـ (أر) الـتى تقع خارج نـطاق المدى المطـلق ٩٨,٣٩ - ١٠٢,٩٣ أو خـارج المدى ٩٨,٩١ - ١٠١,٠٩ باحتـمال

٩٩ ٪ ، يعنى أن هناك احتمالاً قوياً لغش العينة بدهن غريب .

أمكن حساب معادلات أخرى تمثل تآلف بين جليسريدات ثلاثية أخرى فى كل زيت أو دهن غريب تم اختباره مثل زيت فول الصويا، زيت عباد الشمس، زيت النخيل ، زيت نواه النخيل ، زيت جوز الهند ، دهن لحم الخنزير ، حيث كان الحد الأدنى لكشف الغش بالدهن الغريب بمستوى ثقة ٩٩ ٪ ، و ٩٥ ٪ كما يلى على الترتيب : زيت فول الصويا (١,٧ ٪ ، ١,٣ ٪) ، زيت عباد الشمس (١,٥ ٪ ، ١,٢ ٪) ، زيت الزيتون (٢,٢ ٪ ، ١,٧ ٪) ، زيت جوز الهند (٣,٢ ٪ ، ٢,٥ ٪) ، زيت نواه النخيل (٣,٧ ٪ ، ٢,٩ ٪) ، دهن لحم الخنزير (٢,٥ ٪ ، ١,٩ ٪) ، دهن البقر (٥,٣ ٪ ، ٤,١ ٪) .

يرجع سبب الاخفاق بدرجة بسيطة فى تحديد الحد الأدنى الذى يمكن اكتشافه عند حدوث غش عند المقارنة بالاكتشافات السابقة (١٥) إلى وجود اختلافات كبيرة فى دهن الحليب المستعمل ووجود مدى أوسع من التذبذبات بصورة جوهرية ومن أجل التثبت عملياً من صحة طريقة الكشف تم تحضير مجموعة من دهون الحليب المضاف إليها ٢ ٪ من أنواع مختلفة من الدهون الغريبة .

تمثل احدى هذه المجموعات دهون حليبية جمعت أثناء فترة التغذية فى فصل الشتاء (نظام مغلق على أعلاف مركزة) ، والمجموعة الثانية أثناء الصيف (نظام تغذية مفتوح على الأعشاب) ، أما المجوعة الثالثة فتم جمعها أثناء الفترات الانتقالية بينهما .

فى الـ ٢٤ عينة دهن حليب التى أضيف إليها دهن غريب بنسبة ٢ ٪ ، رغم حصولنا على نفس النتيجة باجراء اختبار فى ٢٢ عينة من الـ ٢٤ ، ورغم أن الاختبار كان يعاد مرتين أو ثلاث مرات باستعمال الـ ٦ معادلات التى طورناه

مع الـ ٨ أنواع من هـذه الدهون الغريب ، إلا أن الحد الأدنى الـذى كان يمكن اكتشافه من الدهن الغريب فى كل مرة كان غالباً أعلى من ٢ ٪ .

بالنسبة لكشف الغش بزيوت فول الصويا ، ودوار الشمس ، والزيتون فقد ثبت أن معادلة واحدة فقط تكف لهم جميعاً .

أحرز نجاح فى كشـف الكميات القليـلة من الدهون الغريبـة التى يمكن تتواجـد فى وقت واحد مـع دهن الحليب بـدرجة احتمـال عالية ، حـيث كان الهـدف هو كشـف غش دهن الحـليب بـكميات ضـئيلـة من الدهـون الغريـبة باستعمال معادلاتنا :

تستعمل هذه المعادلة الافتراضية مثلاً فى الكشف بحساسية عن أضافة زيت النخيل :

٩,٨٢٧١ × ك$_{٣٢}$ + ٩٢٢٩,٠ × ك$_{٣٦}$ + ٢,٤٤٣١ × ك$_{٤٤}$ + ١,٥٨٦١
× ك$_{٤٣}$ − ٤,٨٣٠٧ × ك$_{٤٨}$ + ٧,٢٠٣٢ × ك$_{.٥}$ = ٩٥,٨٣ − ١٢,٠٥

(المدى الذى تتأرجح فيه قيمة (أر) بدرجة احتمال ٩٩ ٪ هو : ٩٧,٦١ − ١٠٢,٣٧ ، والانحراف المعيارى لقيم أر هو : (سيجما) = ٠,٥٠٧٤٨ .

فى هذه المعادلة يتـم التعويض عن نسبة الجليسريدات الـثلاثية الموجودة فى جميع الدهون الغريبة النقية ، والرقـم الناتج فى كل دهن غريب يعبر عن قيمة الـ أر أف (RF) .

عادة ما تدور قيم (الـ أر أف) فى الدهون الحلـيبية النقية حول الـ ١٠٠ ، مـن ناحية أخرى يوضح الجدول رقم (١) قـيم الـ أر أف لمختلف أنواع الدهون الغريبة الناتجة بهذه المعادلة .

حيث نجد أن بعض هذه الأرقام تكون أقل من أو أكثر من ١٠٠ ، وهذا يعنى أنه إذا خلط دهن الحليب مع زيت النخيل تزداد الـ (أر) أو (أر أف) طبقاً لمعادلة زيت النخيل المذكورة لأن قيمة الـ (أر أف) لزيت النخيل النقى هى ٢٣١,٦٧ وهذا يعتبر أعلى من ١٠٠ بدرجة واحدة وذلك طبقاً للجدول رقم (١) فى حين إذا أضفنا الآن بعض من زيت فول الصويا الذى له (أر أف) منخفضة (٢٢,١٥) فإنه من السهل أن نحصل على قيمة (أر أف) للمخلوط ككل تدور حول الـ ١٠٠ ، وهذا يعنى أنه لا يمكن اكتشاف حدوث تعديل فى دهن الحليب باستعمال معادلة زيت النخيل فى هذه الحالة .

أمكن تطوير معادلة بسيطة لحساب نسب الدهون الغريبة المختلفة التى قد تستخدم فى عمل أحد معادلاتنا التى تكشف عن الدهون الغريبة الغير مصرح باستعمالها .

$$ب_٢ = \frac{ب_١ \times (١٠٠ - أر\ أف_١)}{(أر\ أف_٢ - ١٠٠)}$$

حيث تمثل $ب_١$ ، $ب_٢$ النسبة المئوية للدهنين الغريبين للذان لهما أر $أف_١$ ، أر $أف_٢$ واللذان إذ خلطا معاً تكون قيمة الـ RF لهما = ١٠٠ باعتبار أن أر $أف_١$ أقل من ١٠٠ وأر $أف_٢$ أكثر من ١٠٠ .

الجدول رقم (١)

متوسط قيم الـ أر أف فى مختلف أنواع الدهون الغريبة باستعمال معادلة زيت النخيل

الدهن الغريب	الدهن الغريب
زيت فول الصويا	٢٢,١٥
زيت دوار الشمس	١٥,٧٨
زيت الزيتون	٢٧,٩٤
زيت جوز الهند	١٥٧,٦٦
زيت النخيل	٢٣١,٦٧
زيت نواه النخيل	١٠٢,٠٥
دهن لحم الخنزير	٩٨,٤٢
دهن لحم البقر	١١٦,٤٩

بمساعدة الحاسب الآلى (الـكومبيوتر) فكرنا فى تطوير مـعادلات تكون فيها جميع قيم الـ أر أف فى مـختلف أنواع الدهون إما أقل أو أكثر من ١٠٠ فينتج عن ذلك أنـه إذا أضيفت عدة دهـون غريبة مـعاً فإن قيم الـ أر أف لا تعوض النقص فى بعضها البعض بل تتزايد بمعدل تصاعدى(*) .

أظهرت الحسابات أن هناك معادلات كثيرة من بين ٣٢,٦٤٧ معادلة محتملة للجـليسريـدات الثلاثيـة ينطبق عـليه هذه الـشروط . ومن بين هـذه المعادلات المناسبـة التى أنطبق علـيها الشروط الأربعة المـذكورة أختيرت بعد ذلـك معادلة عامة لجميع الدهون الغريبة .

والجدول رقم (٢) يوضح المعادلات الـتى تناسب هذه الجليسريدات الثلاثية. تم حساب معادلة مثالية مشتركة لزيوت الصويا، وعباد الشمس ، والزيتون .

(*) هذا يعتبر الشرط الرابع من الشروط التى يجب أن تتوافر فى المعادلة التى يتم اختبارها .

يشتمل الجدول رقم (٢) أيضاً على العبارة «المدى ٩٩ ٪» وهى تمثل الحدود التى تقع داخلها جليسريدات دهن الحليب باحتمال قدره ٩٩ ٪ ، وأيضاً العبارة «سيجما» وهى تمثل الانحراف المعيارى لقيم «أر» .

أظهرت الحسابات الأخيرة والتى أعتمدنا فيها على الجليسريدات الثلاثية فى اشتقاق المعادلات الموضحة فى الجدول (٢) لكشف أى اتحادات بين دهون غريبة ودهن الحليب أنه رغم أن دهن الخنزير يمكن اكتشافه عندما يضاف بنسبة منخفضة تصل إلى ٢,٧ ٪ ، إلا أن هناك زيوت أخرى مثل زيت جوز الهند أو زيت النخيل أو زيت نواة النخيل لا يمكن اكتشافه إلا عند أضافتها بالنسب التالية على الترتيب : ٢٦,٨ ٪ ، ١٢,٥ ٪ ، ١٩,٣ ٪ .

نفس الشئ ينطبق على بعض المعادلت الأخرى فى الجدول رقم (٢) .

وهذا يعنى أنه من الناحية العملية يجب أن تستعمل جميع المعادلات الستة الموضحة أدناه عند اختبار عينة دهن مجهولة سواء كانت العينة موضع السؤال تمثل خليط من دهن الحليب مع دهن واحد فقط أو أكثر من الدهون الثمانية الغريبة .

لهذا الغرض أجريت محاولة بعد ذلك لاستنباط معادلة يمكنها أن تعطى نتائج جيدة بدرجة متساوية مع جميع الدهون الغريبة باستعمال هذه المعادلة الواحدة للجليسريدات الثلاثية . هذه المعادلة المثالية العامة المحسوبة فى هذه العملية هى معادلة الجليسريدات الثلاثية الموضحة فى اخر الجدول رقم ٢ .

الجدول رقم (٢)

معدلات الجليسريدات الثلاثية لكشف أى مخاليط من الدهون الغريبة فى دهن الحليب

معادلة كشف زيوت فول الصويا ، عبد الشمس ، الزيتون :

٢,٠٩٨٣ × ك$_{٣٠}$ + ٠,٧٢٨٨ × ك$_{٣٤}$ + ٠,٦٩٢٧ × ك$_{٣٦}$ + ٠,٦٣٥٣
× ك$_{٣٨}$ + ٣,٧٤٥٢ × ك$_{٤٠}$ – ١,٢٩٢٩ × ك$_{٤٢}$ + ١,٣٥٤٤ × ك$_{٤٤}$ +
١,٧٠١٣ × ك$_{٤٦}$ + ٢,٥٢٨٣ × ك$_{٥٠}$ = أر
أر = ٩٨,٢٠ – ١٠٣,٢٨ ، مدى «أر» بـاحـتـمال ٩٩ ٪ = ٩٩,٠١ –
٩٩,١٠٠ ، سيجما (الانحراف المعيارى) = ٠,٣٨١٥٧

معادلة كشف زيت جوز الهند :

٣,٧٤٥٣ × ك$_{٣٢}$ + ١,١١٣٤ × ك$_{٣٦}$ + ١,٣٦٤٨ × ك$_{٣٨}$ + ٢,١٥٤٤
× ك$_{٤٢}$ + ٠,٤٢٧٣ × ك$_{٤٤}$ + ٠,٥٨٠٦٩ × ك$_{٤٦}$ + ١,٢٩٢٦ × ك$_{٤٨}$
+ ١,٠٣٠٦ × ك$_{٥٠}$ + ٠,٩٩٥٣ × ك$_{٥٢}$ + ١,٢٣٩٦ × ك$_{٥٤}$ = أر
أر = ٩٩,٢٤ – ١٠٠,٨١ ، مـدى «أر» باحـتـمـال ٩٩ ٪ = ٩٩,٧١ –
٢٩,١٠٠ ، سيجما (الانحراف المعيارى) = ٠,١١٣٢٣

معادلة كشف زيت النخيل :

٣,٦٦٤٤ × ك$_{٢٨}$ + ٥,٢٢٩٧ × ك$_{٣٠}$ – ١٢,٥٠٧٣ × ك$_{٣٢}$ +
٤,٤٢٨٥ × ك$_{٣٤}$ – ٠,٢٠١٠ × ك$_{٣٦}$ + ١,٢٧٩١ × ك$_{٣٨}$ + ٦,٧٤٣٣
× ك$_{٤٠}$ – ٤,٢٧١٤ × ك$_{٤٢}$ + ٦,٣٧٣٩ × ك$_{٤٦}$ = أر
أر = ٩٧,٧٢ – ١٠٢,٢٥ ، مـدى «أر» باحـتـمـال ٩٩ ٪ = ٩٧,٨٩ –
٩,١٠٢ ، سيجما (الانحراف المعيارى) = ٠,٨١٠٩٤

معادلة كشف زيت نواة النخيل :

٢,٧٢١٣ × ك$_{٢٦}$ + ٣,٢٩٦٩ × ك$_{٣٢}$ + ١,٥٠٧ × ك$_{٣٦}$ + ١,٣٤٨٦
× ك$_{٣٨}$ + ٢,٠٧٨١ × ك$_{٤٢}$ + ٠,٦٠٧١ × ك$_{٤٤}$ + ٠,٥١٣٨ × ك$_{٤٦}$ +
١,٣٣٠٧ × ك$_{٤٨}$ + ١,٠٣٢١ × ك$_{٥٠}$ + ٠,٩٧٢٧ × ك$_{٥٢}$ + ١,٢٥٢٧
× ك$_{٥٤}$ = أر

أر = ٩٩,٣٣ – ١٠٠,٧٥ ، مدى «أر» باحتمال ٩٩ ٪ = ٩٩,٧٢ –
١٠٠,٢٨ ، سيجما (الانحراف المعيارى) = ٠,١٠٦٥٧ .

معادلة كشف دهن لحم الخنزير :

٦,٥١٢٥ × ك$_{٢٦}$ + ١,٢٠٥٢ × ك$_{٣٢}$ + ١,٧٣٣٦ × ك$_{٣٤}$ + ١,٧٥٥٧
× ك$_{٣٦}$ + ٢,٢٣٢٥ × ك$_{٤٢}$ + ٢,٨٠٠٦ × ك$_{٤٦}$ + ٢,٥٤٣٢ × ك$_{٥٢}$ +
٠,٩٨٩٢ × ك$_{٥٤}$ = أر

أر = ٩٧,٩٠ – ١٠٢,٥٧ ، مدى «أر» باحتمال ٩٩ ٪ = ٩٧,٩٧ –
١٠١,٠٣ ، سيجما (الانحراف المعيارى) = ٠,٣٩٨٩٧ .

معادلة كشف دهن البقر :

١,٠٩٥٦ × ك$_{٣٦}$ + ٠,٥٨٢٩ × ك$_{٣٨}$ + ٤,١٢٤٩ × ك$_{٤٠}$ – ١,١٣٥٧
× ك$_{٤٢}$ + ١,٤٠٢٧ × ك$_{٤٤}$ + ١,٦٩٩٨ × ك$_{٤٦}$ + ٠,٣١٩٢ × ك$_{٤٨}$ +
٢,٠٨٥٩ × ك$_{٥٠}$ = أر

أر = ٩,٣٩ – ١٠٢,٥٣ ، مدى «أر» باحتمال ٩٩ ٪ = ٩٨,٩١ –
١٠١,٠٩ ، سيجما (الانحراف المعيارى) = ٠,٤٢٠٦٢ .

المعادلة العامة لكشف جميع الدهون الغريبة :

٢,٧٥٧٥ × ك$_{٢٦}$ + ٦,٤٠٧٧ × ك$_{٢٨}$ + ٥,٥٤٣٧ × ك$_{٣٠}$ –
١٥,٣٢٤٧ × ك$_{٣٢}$ + ٦,٢٦٠٠ × ك$_{٣٤}$ + ٨,٠١٠٨ × ك$_{٤٠}$ +
٥,٠٣٣٦ × ك$_{٤٢}$ + ٠,٦٣٥٦ × ك$_{٤٤}$ + ٦,٠١٧١ × ك$_{٤٦}$ = أر

أر = ٩٧,٦٣ - ١٠٢,٤٢ ، مـدى «أر» باحـتمـال ٩٩ ٪ = ٩٧,٨٠ - ١٠٢,١٩ ، سيجما (الانحراف المعيارى) = ٠,٨٥١١٤ .

الجدول رقم (٣) يشتمل على الحدود الدنيا التى يمكن اكتشافها من الدهون الغريبة بـاحتمال قدره ٩٩ ٪ والعمـود الأول يوضح الحدود الـدنيا التـى يمكن لأفضل معادلات لدهن الحليب أن تكتشفها ، وذلك عندما تكون بعض قيم الـ «أر أف» فى الدهون الغريبـة النقيـة المراد أكتشافهـا أقل من ١٠٠ ، والـبعض الأخر قيمته أكثر من ١٠٠ ، أما العمود الثانـى فيشتمل على الحدود الدنيا التى يمكن اكتشافها عـندما تكون جميع قيم الـ «أر أف» للدهون الغـريبة النقية . إما أقل من أوزان من ١٠٠ (قارن ذلك بالجدول رقم ٢) ، وهذا يجعل فى المقدرة أكتشاف أى أتحادات بين الدهون لغريبة .

العمود الأخيـر يوضح الحدود الدنيا التـى يمكن أكتشافها أيـضاً فى أى من مخاليط الدهون الغريبة وذلك باستعمال المعادلة العامة ، ورغم أن الحدود الدنيا التى يمكن أكتشافهـا بهذه المعادلة تعتبر عالية نسبياً إلا أن هذه المـعادلة تعتبر فقط هى اللازمة لكشف وجود دهن غريب مجهول .

الجدول رقم (٣)

الحدود الدنيا لكشف غش دهن الحليب بدهن غريب باحتمال قدره ٩٩ ٪

الزيت أو الدهن الغريب	دهن واحد غريب	مخلوط معه دهن غريب أخر	المعادلة العامة
زيت فول الصويا	١,٧	٢,١	٤,٤
زيت عباد الشمس	١,٥	٢,٣	٤,٧
زيت الزيتون	٢,٢	٢,٤	٤,٧
زيت جوز الهند	٣,٢	٣,٥	٤,٣
زيت نخيل	٣,٦	٤,٤	٤,٧
زيت نواة النخيل	٣,٩	٤,٣	٥,٩
دهن لحم الخنزير	٢,٥	٢,٧	٤,٧
دهن لحم البقر	٥,٣	٥,٣	٥,٤

أظهرت حساباتنا الأخرى أن المعادلات الواردة بالجدول (٢) تسمح أيضاً بالتعبير كمياً عن (نسبة) الغش بدهن غريب والعلاقة التالية تبين كيفية حساب نسبة الإضافة من الدهن الغريب لدهن الحليب :

٪ المضافة من الدهن الغريب فى دهن الحليب

$$= \frac{\text{١٠٠} \{ (\text{١٠٠} - \text{أر أ}_{\text{م}}) \}}{\{ (\text{١٠٠} - \text{أر أف}_{\text{م}}) \}}$$

أر أم = يحصل عليها بالتعويض عن الجليسريدات الثلاثية لمخلوط الدهن الغريب ودهن الحليب وذلك فى أحد المعادلات الواردة بالجدول رقم (٢)

أر أفم = متوسط قيم الـ أر أف فى مختلف الدهون الغريبة والتى يحصل عليها

بالتعويض عن قيمة الجليسريدات الثلاثية فى هذه الدهون النقية الغريبة بالمعادلة التى تناسبها بالجدول رقم ٢ . ثم حساب قيم الـ أر أف بالمعادلات السابقة بالجدول رقم (٢) كما يلى :

فى حالة وجود عينة بها دهن غريب مجهول يؤخذ متوسط قيم الـ أر أف فى مختلف الدهون الغريبة ويتضمن (بما فى ذلك) ويتضمن ذلك الـ أر أف لأنواع مختلفة من نفس هذا الدهن الغريب وذلك باستعمال المعادلة المناسبة بالجدول رقم (٢)

وهذا أعطى قيم الـ أر أفم التالية :

أر أفم بمعادلة زيت فول الصويا ، دوار الشمس ، الزيتون : ٤٩,٤٣

أر أفم بمعادلة زيت جوز الهند : ١١٢,٢٦

أر أفم بمعادلة زيت النخيل : ١٠,٥٧

أر أفم بمعادلة زيت نواه النخيل : ١١١,٦٨

أر أفم بمعادلة دهن لحم الخنزير : ١٣٢,١٢

أر أفم بمعادلة دهن لحم البقر : ٤٥,١٦

فى حالة دهن غريب معلوم يمكن تقدير قيمة (أر أفم) بسهولة بالتعويض عن الجليسريدات الثلاثية التى تكون موجودة فى هذا الدهن الغريب المعلوم وذلك فى أدق معادلة خاصة بهذا النوع من الدهن مع دهن الحليب على سبيل المثال أختبرت أربعة أنواع من دهن لحم البقر باستخدام المعادلة المناسبة لكشف دهن البقر والواردة فى الجدول رقم (٢). وبعد تقدير متوسط قيم الـ «أر أفم» بهذه الطريقة كانت كما يلى :

أر أفم بمعادلة زيت فول الصويا ، دوار الشمس ، الزيتون : ١٠,١٢

أر أفم بمعادلة زيت جوز الهند : ١١٨,١٣

أر أفم بمعادلة زيت النخيل : ٧,٥٥

أر أفم بمعادلة زيت نواه النخيل : ١١٢,٦٢

أر أفم بمعادلة دهن لحم الخنزير : ١٧٧,٥٥

أر أفم بمعادلة دهن لحم البقر : ٥٤,١٨

فى حالة المعادلة العامة للجليسريدات الثلاثية كانت الـ RF للدهن المجهول الغريب دائماً : ٧,٤٦ . علاوة على ذلك تم خلط دهون حليبية ناتجة من تغذية على فترات زمنية مختلفة مع الزيوت أو الدهون الغريبة التالية المضافة بنسبة (٣ - ٦ ٪) زيت فول الصويا ، زيت جوز الهند ، زيت نواة النخيل ، دهن لحم الخنزير ، وقد تم تحليل توزيع الجليسريدات الثلاثية الناتجة .

والجدول رقم (٤) يوضح النسب المضافة كمياً من الدهن الغريب مع دهن غريب غير معروف أبتداءاً ، وقد تم حساب توزيع الجليسريدات الثلاثية نظرياً فى هذه العينة المخلوطة مرة على أساس أن الدهن الغريب هذا معروف ، ومرة على أنه غير معروف .

تشير النتائج الكمية أن معادلتى زيت النخيل والمعادلة العامة فقط بالجدول رقم (٢) هما اللذان يعطيان نتائج متماثلة لكشف وجود الدهن الغريب بكمية منخفضة ، وعند التعويض فى معادلات أخرى بحث آخر خلاف تلك المذكورة بالجدول رقم (٢) فقد حصلنا على نتائج غير صحيحة .

الجدول رقم (٤)

الكشف كمياً عن نسب الدهون الغريبة الموجودة بحالة فردية بمفردها فى دهن الحليب باستعمال معادلتى زيت النخيل والمعادلة العامة المذكورة بالجدول رقم (٢) حيث كان دهن الحليب ناتجاً من تغذية الماشية على فترات زمنية متفرقة

متوسط قيم الـ أر أف فى الدهن الغريب	النسبة المئوية للدهن الغريب المحسوبة نظرياً باستعمال		
	معادلة زيت النخيل		المعادلة العامة
	٧,٥٥ (محسوبة نظرياً) الدهن الغريب معلوم لدينا (يضاف بنسبة قليلة غير مميزة)	١٠,٥٧ بالتعويض بتغير الجليسريدت الثلاثية للدهن الغريب المجهولماف بزيت النخيل	٧,٤٦ (محسوبة عملياً) الدهن الغريب غير المعروف (يضاف نسبة قليلة غير مميزة)
دهن حليب ناتج من ماشية غذيت فى الشتاء + ٣,٤ ٪ زيت فول صويا	٢,٣	٢,٤	٢,٥
+ ٢,٨ ٪ زيت جوز هند	-	-	٢,٨
+ ٣,٩ ٪ زيت نواة النخيل	-	-	٢,٧
+ ٦,٣ ٪ دهن لحم الخنزير	٥,٩	٦,١	٦,٠
دهن حليب ناتج فى فترة انتقالية (بين الصف والشتاء			
+ ٣,٤ ٪ زيت فول صويا	٤,٥	٤,٧	٤,٧
+ ٢,٨ ٪ زيت جوز هند	-	-	٢,٤
+ ٣,٩ ٪ زيت نواة النخيل	٣,٣	٣,٤	٤,١
+ ٦,٣ ٪ دهن لحم الخنزير	٦,١	٦,٤	٦,٢
دهن حليب ناتج من ماشية غذيت فى الصيف + ٣,٤ ٪ زيت فول صويا	٣,٣	٣,٤	٣,١
+ ٣,٩ ٪ زيت نواة النخيل	٤,٧	٤,٩	٤,٩
+ ٦,٣ ٪ دهن لحم الخنزير	٧,٦	٧,٨	٧,٥
متوسط الانحراف المطلق	٠,٧٠ (نظرياً)	٠,٧٠ (عملياً)	٠,٦٨

يشتمل الجدول رقم (٤) أيضاً على متوسط الانحراف المطلق فى العينات التى خلطت عملياً بالفعل والتى تم حسابها نظرياً وواضح من الجدول أنه يمكننا الحصول على نتائج كمية جيدة نسبياً حتى مع الدهن الغريب غير المعروف لدينا. سواء باستعمال معادلة زيت النخيل أو المعادلة العامة ، حيث كانت الانحرافات النسبية عند أضافة كميات فعلية ١٦,٦ ٪ فى حالة معادلة زيت النخيل ، و ١٦,١ ٪ فى حالة المعادلة العامة ، وعموماً فى المتوسط تظهر المعادلة العامة بدايات كشف أقل نسبياً عما لو استعملنا معادلة زيت النخيل مع الأنواع المختلفة من الدهون الغريبة ، وتبعاً للنتيجة المذكورة آنفاً فإنه يمكن لمعادلة زيت النخيل على خلاف غيرها أن تكشف وتميز جيع المواد التى تضاف.

فى تجارب أخرى أجريت تم عمل مخاليط من دهن الحليب (الدهن الشتوى) مع نسب أكبر نسبياً على سبيل المثال (٥ ٪ ، ١٠ ٪ ، ١٥ ٪) من زيوت جوز الهند ، النخيل ، دهن الخنزير ، دهن البقر ، وتم قياس توزيع جليسريداتها الثلاثية .

والجدول رقم (٥) يقارن بين هذه النسب المئوية المضافة عملياً أو تجريبياً مع النسب المئوية المحسوبة نظرياً بمعادلات زيت النخيل والمعادلة العامة ، بافتراض حدوث الغش بنوع غير معروف من الدهن .

وعند عمل مقارنة للأرقام الفعلية (٥ ٪ ، ١٠ ٪ ، ١٥ ٪) مع تلك المحسوبة نظرياً باستعمال كلا من معادلتى زيت النخيل والمعادلة العامة ، يظهر لنا تطابق جيد فيما يتعلق بمتوسط الانحراف النسبى للمخاليط حيث يكون ٨١, (فى معادلة زيت النخيل) ١,١٣ فى المعادلة العامة . مخاليط زيت النخيل ، دهن الخنزير ، دهن البقر المضافة بنسبة ١٠ ٪ لكل منها مع دهن الحليب والتى يمثلها مخاليط الدهون الغريبة الموضحة فى الشكل رقم (٤) لم يتم التعرف عليها اعتماداً على معدلات التذبذب فقط . ولذا فإن معادلات الجليسريدات الثلاثية

قد مكنت من إجراء كلاً من الكشف الوصفى والتحليل الكمى النسبى المضبوط لمختلف الدهون الغريبة المضافة لدهن الحليب .

الجدول رقم (٥)

الكشف كمياً عن إضافة ٥ ٪، ١٠ ٪، ١٥ ٪ من زيت جوز الهند ، وزيت النخيل ، ودهن الخنزير ، ودهن البقر لدهن الحليب ، وذلك باستعمال معادلتى زيت النخيل والمعادلة العامة بالجدول رقم (٢)

متوسط قيمة الـ أر أف			النسبة المئوية المضافة من الدهن الغريب المحسوبة نظرياً باستعمال	
			بمعادلة زيت النخيل (١٠,٥٧)	بالمقارنة العامة (٧,٤٦)
فى حالة إضافة	٥ ٪ زيت جوز الهند	لدهن الحليب	٤,٨	٥,٤
	١٠ ٪ زيت جوز الهند		٩,٨	١٠,٧
	١٥ ٪ زيت جوز الهند		١٤,٢	١٥,٥
فى حالة إضافة	٥ ٪ زيت نخيل	لدهن الحليب	٤,١	٣,٩
	١٠ ٪ زيت نخيل		٩,٣	٨,٩
	١٥ ٪ زيت نخيل		١٣,٩	١٣,٢
فى حالة إضافة	٥ ٪ دهن لحم الخنزير	لدهن الحليب	٤,٢	٣,٩
	١٠ ٪ دهن لحم الخنزير		٩,٢	٨,٧
	١٥ ٪ دهن لحم الخنزير		١٥,٠	١٤,٢
فى حالة إضافة	٥ ٪ دهن لحم البقر	لدهن الحليب	٣,٧	٣,٤
	١٠ ٪ دهن لحم البقر		١٠,٧	١٠,٤
	١٥ ٪ دهن لحم البقر		١٢,٨	١٢,٢
متوسط الانحراف المطلق			٠,٨١	١,١٣

أجرى الحليل الكروماتوجرافى الغازى لـ ٣٣ مخلوطاً أخراً كل منها يشتمل على دهنين غريبين أضيفا لدهن حليب ناتج من تغذية الماشية فى الصيف ، الشتاء ، فترات نتقالية ، وذلك للتأكد من معادلات الجليسريدات الثلاثية مرة أخرى . وقد كانت الكمية المضافة عن الدهن الغريب ٥ - ٨ ٪ فى كل حالة .

فوجد حدوث تفونت وأختلاف كبير عند استعمال المعادلات الواردة فى أبحاث سابقة لكشف وجود الدهون الغريبة فى دهن الحليب ، أما فى هذا البحث فأمكن باستعمال الـ ٧ معادلات الموضحة فى الجدول رقم ٢ أثناء التحليل الوصفى لهذه المخاليط أن نكشف على جميع المخاليط الـ ٣٣ باستعمال ٥ معادلات على الأقل من الـ ٧ معادلات ، رغم أنه كانت تكفى معادلة واحدة فقط من هذه المعادلات لأعطاء البرهان والإثبات المؤكد لحدوث عملية الغش بدهن غريب .

وفى الاختبارات الكمية التى يفترض فيها إضافة دهن غير معروف ، نجد أن كلا من معادلتى زيت النخيل والمعادلة العامة قد أعطت متوسط أنحراف نسبى منخفض نسبياً عن النسب الفعلية التى أضيفت والتى كانت ١٣,٧ .

عموماً أظهرت الدراسات أنه عند تحديد أزثير نظام التغذية على تركيب دهن الحليب فإن ذلك مكن من الحصول على معادلات للجليسريدات الثلاثية للكشف كمياً ووصفياً بدرجة حساسية لمدى واسع جداً من الزيوت والدهون الحيوانية فى دهن الحليب الطبيعى .

ومع ذلك يجب التركيز على أن الطرقة المشروحة هنا لا يمكنها أن تقدر طبيعة الدهن الغريب المضاف فى الحال .

التجارب التى أجريت على عينات الحليب المركبة (الممزوجة) تعتبر ممثلة على الأقل لعينات دهن الحليب التى تختبر فى ألمانيا الاتحادية .

أظهرت تجارب أخرى أجريت على ١٥ عينة دهن حليب نقى جمعت من ٦ دول أوربية وجود الغش فى حالتين فقط من بين ١٠٥ أحتمال نفس دهن الحليب بالدهن الغريب (٧ معادلات فى ١٥ عينة طبقاً للجدول رقم ٢) رغم أنها كانت مغشوشة بنسبة أقل بدرجة كبيرة من جدول بداية الكشف الموضحة فى الجدول رقم ٣ (طبقاً للمعادلات الواردة بالجدول رقم ٢)

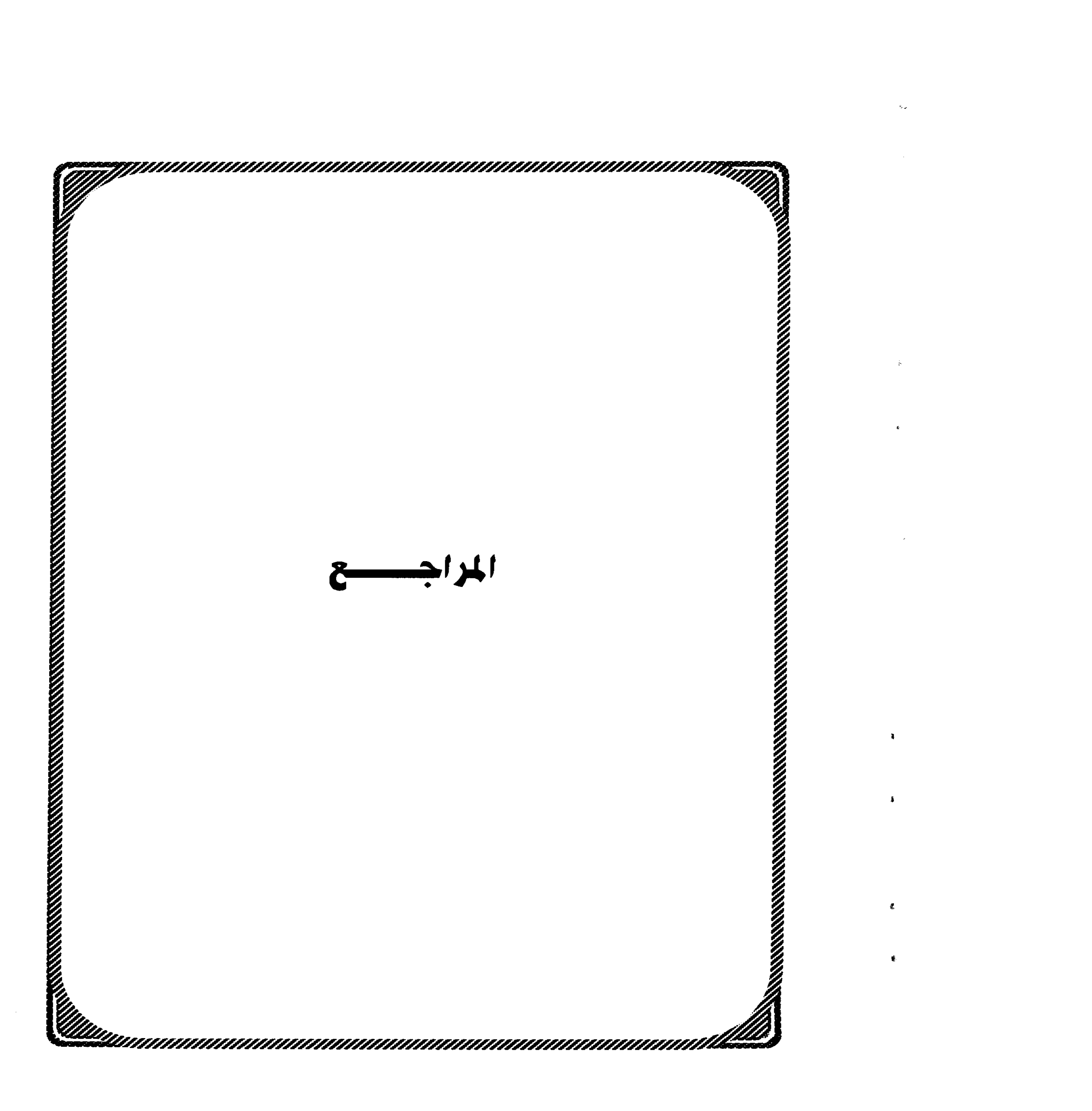
إذا أفترضنا وجود دهن واحد غريب فقط بحالة فردية ، وعند الكشف عنه بمعادلات الكشف الخاصة بوجود دهن واحد وجدنا أنه أعلى من حد بداية الكشف فى هذه المعادلات فمعنى ذلك أن هذه الطريقة تصلح فى ألمانيا الغربية والدول الأخرى أيضاً . يمكن التوصل بوسائل خاصة أخرى مناسبة إلى اشتقاق معادلات أخرى لكشف دهون الحليب الممثلة لعدد من الدول المختلفة . وفى هذه الحالة فإن التوسع فى استعمال برامج للحاسب الآلى (الكومبيوتر) قد يصبح شيئاً زائداً خاصة إذا عمل اتحادات بين الجليسريدات الثلاثية فى الجدول رقم ٢ وكانت غير صحيحة ، وأعيد إجراء التقدير بعوامل (مثل أر أف ، سيجما) أقل درجة .

يمكن بسهولة أيضاً حساب تأثير بعض العوامل الأكثر عمومية على مختلف المعادلات ، وذلك بأضافة عدد من عينات دهن الحليب الناتجة من التعرض لتغيرات شديدة فى نظام التغذية (فى ألمانيا الغربية مثلاً) .

ويجب التأكيد على أن هذه الطريقة فى الكشف لا يمكن تطبيقها على عينات دهن الحليب الناتجة من أبقار تعرضت لنقص شديد فى التغذية (كتلك التى تأخذ نصف احتياجها فقط من الطاقة) .

من ناحية ثانية أظهرت تجارب أخرى أجريت أنه يمكن أكتشاف وجود دهن غريب جرى خلطه فى عينة دهن حليب مجهولة ، بدرجة احتمال عالية حتى

تحت مثل هذه الظروف القاصية من التغذية وذلك إذا أشير لذلك فى المعادلات، وفى نفس الوقت كان الفرق بين ك$_{٥٢}$ ، ك$_{٥٤}$ أقل من ٦ ٪ (٢٧) .
يمكن اعتبار تحليل الجليسريدات الثلاثية بالأعمدة المعبأة طريقة بسيطة وحساسة للكشف عن وجود الدهون الغريبة شريطة أن يؤخذ فى الاعتبار بعض القواعد المنهجية فى بحوث سابقة .



المراجـــع



المراجـــــع

المرجع العربية :

- القرآن الكريم .
- جامعة الدول العربية ١٩٧٢ «طريقة قياسـية لتمييز دهن الخنزير فى الزيوت المهدرجة والدهون الحيوانية» المنظمة العربية للمواصفات والمقاييس .
- الهـيئة العربية السعودية للمـواصفات ولمقاييس ١٩٨٧ «الكشف عن دهون الخنزير فى الأغذية» .

المرجع الأجنبية :

- Abdel - Fattah. L. E. Detection and determination of pig fat in other animal fats M.sc. theris Faenlty of farnacy Cairo University, 1970.
- Abdel - Fattah. L. E. Analysis study of some food and parmaceutical lipids products ph. D. thesis Faculty of Pharmacy. Cairo University, 1974.
- Abo Eol Fattah, L. Sayed Ph. D. of pharmacy thesis (Analytical chemistry). Cairo University, 1974.
- Amer, M M, Abdel Kader S., Ahmad and Laila El Sayed procceding from the third Arab congeress, 1972.
- A. O. C. S., official and tentative Methods the american oil chemists society, 2 nd ed chicago III. Ionois, 1964.

- AOAC. Official methods of analysis of the association of official Dgrianltural chemists, 12th ed. Washington, D. C., 1975.
- Atassi, M, Z, Th Complete antigenic strudure of myogobin : Approches and conculusions for antigenic structures of proteins ch. 3 in immuno chemistry of proteins, vol II, 1977.
- Barford, R. A., Luddy, EF., erb, S.F, Madidman, p. and Riemenschneider, Glycerid distribution in adipose and liver glycerides of animals. J Amer. oil cemists, Soc. 42, 1965.
- Brocherhoff, H., Hoyle, R. J. and Wolmark, N. Positional distribution of fatty acids in trigly cerides of animal depat fats. Biochem. Biopys. Acta, 116, 1966.
- Bruce, W., R. Pork lootest USDA protocal kit for Elisa detection of pork in cooked or canned mat products, ABC research laboratory manual, Gainesville, Florida, 1989.
- Carnegie, P. R., Ilic, M. Z., Etheridge, M.O., and collins, M. G., Improved high. performance liquid chromates graphic method for analysis of histidine dipeptides anserine, carhosine and balenine present in Fresh meat, J. of chromatography, 261, 1983.
- Carnegie, P. R., Handbook of HPLC for the separation of amino acid, peptides and proteins, Vol. II, W. S. Hancock (ed.), CRC Press, Boca Raton, Fbrida, 1983.
- Carnegie, P.R., Collino, M. G. and Ilic, M. Z., use of histidine

dipeptides to estimate the proportion of pig meat in processed meats. Meat science, 10, 1984.

- Cattaneo, P., Blanchi, M., A, Beretta, G. and Cantoni, C. keeping characteristico of lamb and its nutritive value, Industeria, Alimentri, 18 (9), 1979.
- Cauglity, E. J. and Lehman, L. W., The preparation of Alkyl Esters from highly unsaturated trigly cerides, J. Am. oil chem. Soc. 42, 1963.
- Codex Alimentarius, Volume XI, part II, P. 149, Stern 28, 1981.
- Coleman, M. H., The pancreatic hydrolysis of natural fats. III The influence of the extent of hydrolysis on monoglycerides composition J. Am. oil chem. soc. 40, 1963.
- Cortecs diagnostics, Biokits, Cooked meat species identification kit, for the qualitative detection of species content in cooked meats, meat products and animal feeds by enzyme immuno assay, U. K., 1993.
- Cortecs diagnostics, Biokits, Meat species Identification for the quantitative ditection of pork content in uncooked meat and meat products by enzyme immuno assay (High Sensitivity), U.K, 1994.
- Dashlouty, A.A. Studies on the quality some meat products, thesis, Foeulty of Agric. Ain shans university 1978.

- Dattillo, M. and congiu F., Separation of soluble proteines of lambs and kids of different agea, by means of isoelective focusing, rivista dizootecny veterinaria No 159, 1978.
- Day, J. A. and Lumley, I. D., Detection and determinatio.n of pork in other fats. The laboratory of the Government chemist., corwall house, Waterloo, London, 1985.
- Distav, E., an Baur. F., The determination of mono - Gli. and triglyeeride concentration by columon chromatography J. Assoc. office, Agr. chemists. 48, 1965.
- El Dashlouty, A., Comparative studies on the canned beef and pork. J. fod Sa. g. No. 112 PP. 1-12, 1981.
- El mossalami, E., El Nawawi, F., Roushdy, S. and El afify Meat Hygiene and technology, Cairo University, Faculty Veternary medicine, 1995.
- El Sayed, L. and Dashlauty, A. The detection and determination of pork in canned meat and sausages, La rivista italiana delle sostanze grasse - vol. Lvi, 1979.
- Hamm, R, In : The physiology and biochemistup of muscle as a food, University of Wisconsin pross, Madison, 1966.
- Harris, H, and Hopkinson, D.A., Handbook of Enzyme Electrophoresis in human genatics North - Holland, 1976.

- Hayden, A. R., Detection of chicken flesh in beef susage, J. food Sci, 42, 1977.
- Hayden, A. R., Immunochemical determinatis of species of crigin of meat products. Ph. D thesis, University of Wisconsin, Madison, 1979 a.
- Heinert, H. H. and klinger, A. Specis - Specific protein differentiation. protien and enzyme patterns in roe deer & red deer, Die fleisch wirtschaft, 60, 1980.
- ISo, 6800, 1985 E.
- Janssen, F. W., Voortman, G, and De Baaÿ, J. Detation of weat gluten, whey proteine, casein, oralbumin and soy proteinin heated meat Unters, Forsch, 1987.
- Hanssen, F.W., Hagele, G.H., voorpostel, A.M.B., and de BAA J. A., Myoglobin analysis for determination of beef, pork, Horse, sheep, and kangaroo meat in blended cooked products, J. of food science, V. 55, No. 6, 1990.
- King, N. L. Species identification of cooked meats by Enzyme - staining of isoelectric focusing Gels, Csiro division of food research, meat research laboratory, Cennon Hill, Queensland, Australia, 1984.
- Mattson F.H, Volpenhein, R.A, and Lutton E.S., Patterns in the triglyceride structure of natural fats, fatte selfen anstrichmitiel 4, 1973.

- Nour El Din, H., Soluman, A., Ashour, F., and Bayoumi, A. chemical composition of pork anf matton in Egypt, Food tecnology Dep. Faculty of Agriclture Moushtoher, Zagazig university, 194.
- Olsman, W. J., Slump, P. Developments in meat Science - 2, Applied Science publised London, 1981.
- Pavlovski, P. E., and palmin, V. V., Biocenistup of mat and meat products. Food industrey pub. Moscow, 1963.
- Pearson, D., The cemical analysis of food, National college of ffod. Tech. Univ. of reading, weybeidge, surry. J. and A. chirch 1970.
- Prasad V., S. S. and Misra, D. S., Differentiation of meats of diffeerent species of animals by muscle esterase pattern in different age and sex groups. Indian J. Anim Sci 51, 1981.
- Ruaeaff, L., and Karleskind, Analysis of animal fat mixtures cooked meat products and derivatives, are free from pork fat,. department for research and analytical fermulation laboratives wolff - clichy, 1983.
- Slam, M., Hamed, O., Nahed, G. and Wafaa, W. Zoonses, Cairo University, Fuculty of veteriuary medicine, Hygiene, Hasbandry and zoonos Department 1995.
- Sokolov, A. A., Physico - cemical ands biochemical basis of meat products technology. food industry pub., Moscow, 1965.

- Stinson, C. G., Deman,J. M. and Bowland, J. P., Fotty acid composition and glyceride structure of piglet body fat from different sampling sites, J. Amer, oil chemists soc. 44, 1967.
- Thomas, A. E., scharaum, J. E., and Rolston, , Quantitative estimation of isomaric monoglyerides by thin layer chromatography, J. Am, oil chem, soc. 42, 1965.
- Tuna, N. and Mangold, H. K. Evaluation of the areleriorclerotie plaque, the university of chicago, 1965.
- Williams S. K. A., oil fats and fatty acids. Their practical examination faurth Edition J. and A chuschill LTD London, 1966.

الفهـــرس

الموضـــــوع | **الصفحة**

مقدمة ٩

الجـــزء الأول

الباب الأول

أدلة تحريم الخنزير فى الإسلام ١١

الباب الثانى

التركيب الكيميائى للحوم الخنزير

والحيوانات الأخرى ١٣

الباب الثالث

الكشف عن لحم الخنزير ٢٣

الفصل الأول

- الكشف عن لحم الخنزير فى اللحوم غير المعاملة حراريا ٢٥
- الكـشف عن لحم الخـنزير فـى اللحـوم غير المعـاملة حـراريا باستخدام طريقة كورتكس البريطانية ٢٥
- الكشف عن أنواع اللحوم غير المعـاملة حراريا باستخدام نظام اليسا المتبع فى المعمل البيطرى الإقليمى بمدينة بيتالا باستراليا ٣٤

الموضـــوع **الصفحة**

- التعرف على أنـواع اللحوم باستخدام طريقـة الكروماتوجراف السائل ذو الأداء العـالى لتحليل هيســتدين ثنائى الببـتيـدات أنسرين ، كارنوسين بالنين فى اللحوم الطازجة ٤١

الفصل الثانى

- الكشف عن لحم الخنزير فى اللحوم المعاملة حراريا ٤٩
- الكـشف عن لحـم الخنزيـر فى اللحـوم المعامـلة حراريـا فى اللحوم ومنتجاتها بواسطة الكت طريقة كورتكس البريطانية ٥١
- الكـشف عن لحـوم الخنزيـر فى اللـحوم المعـاملة حـراريا أو منتجات اللحوم المعلبة بطريقة اليسا ٦٠
- الكشف عـن أنواع لحوم الحيوانات المـعاملة حراريا والـلحوم المعلبة ولحوم الدواجن بطريقة الارتباط الانزيمى ٧٢
- تمييز أصناف اللـحوم المعاملة حراريا بواسطة البـصمة الانزيمية على الجيل ذو التركيز المتعادل كهربائيا ٨١
- استخدام هيستـيدين ثنائى الببتيدات فى تقـدير لحم الخنزير فى اللحوم المصنعة ١٠١
- تحليل الميوجـلوبين للكشف عن لحوم البقـر والخنزير والخيول والغنم والكانجارو فى منتجات اللحوم المخلوطة ١١١
- الكشف عن لحوم الخنزير فى منتـجات اللحوم المعاملة حراريا والمعلبة باستخدام طريقة تقدير الثيامين (فيتامين ب$_{١}$) فيها ١٢٠

الموضـــوع

الجزء الثانى
الكشف عن دهون الخنزير فى المنتجات الغذائية

مقدمة ١٢٩

الباب الأول

تركيب وخصائص دهن الخنزير ١٣١

الباب الثانى

الكشف عن دهن الخنزير ١٤١

الفصل الأول

- تحليل مخلوط من الدهون الحيوانية فى اللحوم المعاملة حراريا للتأكد من خلوها من دهن الخنزير ١٤٣

الفصل الثانى

- الكشف عن دهون الخنزير المضافة للحوم المصنعة ١٥٧

الفصل الثالث

- كشف وتقدير دهون الخنزير فى الدهون الأخرى ١٦٧

الفصل الرابع

- طريقة قياسية لتمييز دهون الخنزير فى الزيوت والدهون المهدرجة . ١٨٥

الفصل الخامس

- تقديـر دهن الخنزير والـدهون الحيوانيـة والنباتيـة فى دهن الحليب ١٩١

المراجع ٢٢٣

الفهرس ٢٣٣

تم بحمد الله

مطابع الشريم
Al-Shraim P.Press
الدمام - تلفون: ٨٤٣٢٩٦٣ - ٨٤٢٩٠٠٢ - فاكس: ٨٤٣٢٩٥٥
Dammam - Tel.: 8432963 - 8429002 - Fax : 8432955